HERMANN MATTENHEIMER

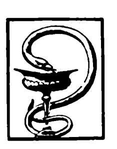
—

ENZYMOLOGIE FÜR DEN PRAKTISCHEN ARZT

HERMANN MATTENHEIMER

PRESBYTERIAN-ST. LUKE'S HOSPITAL CHICAGO, ILLINOIS, USA

Enzymologie für den praktischen Arzt



VERLAG HANS HUBER BERN
UND STUTTGART

DR. MED. HEINRICH RUHE

ZUM GEDENKEN

TYPOGRAPHIE: BENTELI AG · BERN-BÜMPLIZ

PRINTED IN SWITZERLAND

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
ATP-ase	Adenosintriphosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ALD	Aldolase
ADH	Alkohol-dehydrogenase
ARG	Arginase
CA	Kohlensäureanhydrase
CK	Creatin-kinase
Cyt. oxyd.	Cytochrom-oxydase
CE	Cholinesterase
CoA	Coenzym-A
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ENO	Enolase
GAPDH	Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
GPDH	α-Glycerophosphat-dehydrogenase
GOT	AspAT = Aspartat-aminotransferase
GPT	AlAT = Alanin-aminotransferase
GDH	Glutamat-dehydrogenase
HK	Hexokinase
β-HBDH	β-Hydroxybutyrat-dehydrogenase
ICDH	Isocitrat-dehydrogenase
ITP	Inosintriphosphat
IDH	Inosindiphosphat
LDH	Lactat-dehydrogenase
MDH	Malat-dehydrogenase
NAD ($NADH_2$)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid ($DPN/DPNH_2$)
NADP ($NADPH_2$)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat ($TPN/TPNH_2$)
P	anorganisches Phosphat
PP	Pyrophosphat
PFA	Fructose-1-phosphat-aldolase
PGDH	6-Phosphogluconat-dehydrogenase
PK	Pyruvat-kinase

RNS	Ribonucleinsäure
SUDH	Succinat-dehydrogenase
UTP	Uridintriphosphat
UDP	Uridindiphosphat

VORWORT

In zunehmendem Umfang gewinnt die Enzymologie Bedeutung für die klinische Diagnostik. Veränderungen der Enzymmuster im Blutplasma erlauben Schlüsse auf Art, Schwere und Verlaufsform von vielen Erkrankungen. Eine Reihe erblicher Stoffwechselstörungen kann auf das Fehlen oder die Unterfunktion eines einzigen Enzyms zurückgeführt werden. Der Nachweis eines solchen Enzymmangels ist von außerordentlichem differentialdiagnostischem Wert. Mit der Einführung der Nadelbiopsie sind nun auch Enzymuntersuchungen an Organen möglich geworden. Obwohl wir heute erst langsam beginnen, die Zusammenhänge zwischen Erkrankungen und Veränderungen von Enzymmustern in einem Organ zu verstehen, so sind die bisherigen Ergebnisse doch vielversprechend. Der in der Praxis stehende Arzt kann sich schon aus zeitlichen Gründen kaum mit der umfangreichen Spezialliteratur auf den vielen Teilgebieten der Medizin befassen. Ich habe daher den Vorschlag des Verlages Hans Huber, Bern, ein Buch über Enzymologie für den praktischen Arzt zu schreiben, gerne aufgegriffen. Die Darstellung soll auch dem biochemisch weniger bewanderten Kollegen einen verständlichen Überblick und Anregungen verschaffen.

Die Arbeiten in unserem Laboratorium werden durch den Grant Nr. HE 03912, den Career Development Award Nr. 5-K3-GM 15524 vom United States Public Health Service und den Kontrakt Nr. DA-49-193-MD-2695 mit dem Surgeon General, U.S. Army, unterstützt.

Chicago, Illinois USA
März 1966

H. MATTENHEIMER

EINIGE GRUNDLAGEN DER ENZYMOLOGIE

DEFINITION UND EIGENSCHAFTEN DER ENZYME

Enzyme sind Proteine mit spezifisch katalytischen Funktionen. Alle bisher in reiner Form dargestellten Enzyme sind Albumine oder Globuline und haben demzufolge alle für Proteine charakteristischen Eigenschaften.

Proteine sind multivalente Elektrolyte. Freie ionisierbare Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren verleihen ihnen die Eigenschaften sowohl von Säuren als auch Basen. Die Ionisation der freien Gruppen ist eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration. Als Elektrolyte wandern Proteine im elektrischen Feld, und zwar beim Überwiegen positiver Gruppen im Proteinmolekül zur Kathode, beim Überwiegen negativer Gruppen zur Anode. Von dieser Eigenschaft wird bei der Elektrophorese Gebrauch gemacht. Unterscheiden sich in einem Proteingemisch die einzelnen Proteine in der Anzahl ihrer ionisierten Gruppen, so wird

Tabelle 1. Kristallisierte Enzyme (Auswahl)

Enzym	Gewebe	Spezies
Pepsin	Magensaft	Schwein
Trypsin	Pankreassaft	Rind
Chymotrypsin	Pankreassaft	Rind
Arginase	Leber	Rind
Desoxyribonuclease	Leber	Rind
α-Amylase	Pankreas	Mensch
Lysozym	Milz	Kaninchen
Alkohol-dehydrogenase	Leber	Pferd
Glycerolphosphat-dehydrogenase	Muskel	Kaninchen
Lactat-dehydrogenase	Herz	Rind
Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase	Muskel	Kaninchen
Katalase	Leber	Rind
Adenylat-kinase	Muskel	Kaninchen
Pyruvat-kinase	Muskel	Kaninchen
Creatin-kinase	Muskel	Kaninchen
Phosphogluco-mutase	Muskel	Kaninchen
Ribonuclease	Pankreas	Rind
Fumarat-hydratase	Herz	Schwein
Aldolase	Muskel	Kaninchen
Glutamat-dehydrogenase	Leber	Rind

das Protein mit dem größten Nettogehalt an negativen Gruppen ($-COO^-$) am schnellsten bei der Anlegung einer Spannung zur Anode wandern.

Mit der Elektrophorese gelingt es, ein Gemisch von Enzymen zu trennen. Für die klinische Enzymdiagnostik wird dieses Verfahren zur Trennung von Isoenzymen (s. unten) angewandt.

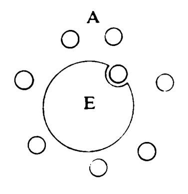
Als Proteine denaturieren Enzyme leicht, was gleichbedeutend mit einem Verlust an katalytischer Aktivität ist. Es sind aber schonende Verfahren ausgearbeitet worden, die es gestatten, Proteine in nativem Zustand zu präparieren. In erster Linie ist die Ausfällung mit Neutralsalzen (Natriumsulfat und Ammoniumsulfat) zu nennen. Bei Temperaturen von 0 °C und darunter können auch organische Lösungsmittel wie Äthanol, die bei höheren Temperaturen Proteine denaturieren, zur Fällung verwendet werden. Die Kombination verschiedener Methoden ermöglicht es, Enzyme aus Organen in mehr oder weniger reiner Form zu isolieren. Als höchster Reinheitsgrad wird die kristallisierte Form eines Proteins angesehen. In Tabelle 1 sind einige Enzyme aufgeführt, die in kristallisiertem Zustand erhalten wurden. Kristallisierte Enzyme sind heute wichtige Reagenzien in der biochemischen und klinisch-chemischen Diagnostik.

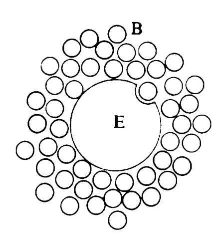
DIE ENZYMAKTIVITÄT BEEINFLUSSENDE FAKTOREN

Die Aktivität (Menge an Substrat, umgesetzt pro Zeiteinheit) eines Enzyms hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Enzymreaktionen werden mit Erhöhung der *Temperatur* beschleunigt. Als Faustregel gilt, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Temperaturerhöhung von 10 °C verdoppelt. Bei 40 °C besteht aber eine Grenze, da Hitzedenaturierung (eine allgemeine Eigenschaft der Proteine) eintritt. Enzymreaktionen sind abhängig von der *Wasserstoffionenkonzentration.* Wird die Aktivität einer gegebenen Enzymmenge bei verschiedenem pH gemessen und in einem Diagramm gegen das pH aufgetragen, so resultiert eine Kurve mit einem mehr oder weniger scharfen Maximum. Das Maximum ist aber außer vom pH auch noch von anderen Faktoren, wie Salzgehalt der Inkubationslösung, Art des verwendeten Puffers usw. abhängig. Greift ein Enzym verschiedene Substrate an, zum Beispiel die wenig spezifische alkalische Phosphatase, so kann das pH-Maximum auch mit dem verwendeten Substrat variieren.

Die Voraussetzung für die Enzymwirkung ist die Verbindung des Enzyms mit seinem Substrat

$$S + E \rightarrow ES \rightarrow E + P$$





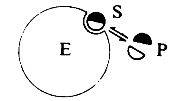


Abb. 1. Enzym-Substratsättigung.
E = Enzymmolekül, S = Substratmolekül, P = Reaktionsprodukt.
Ist die Substratkonzentration gering (A), so wird nach der Spaltung von S einige Zeit vergehen, bis das nächste S auf das «aktive» Zentrum des Enzyms trifft. Bei hoher Substratkonzentration (B) wird das «aktive» Zentrum sofort wieder von einem S besetzt werden.

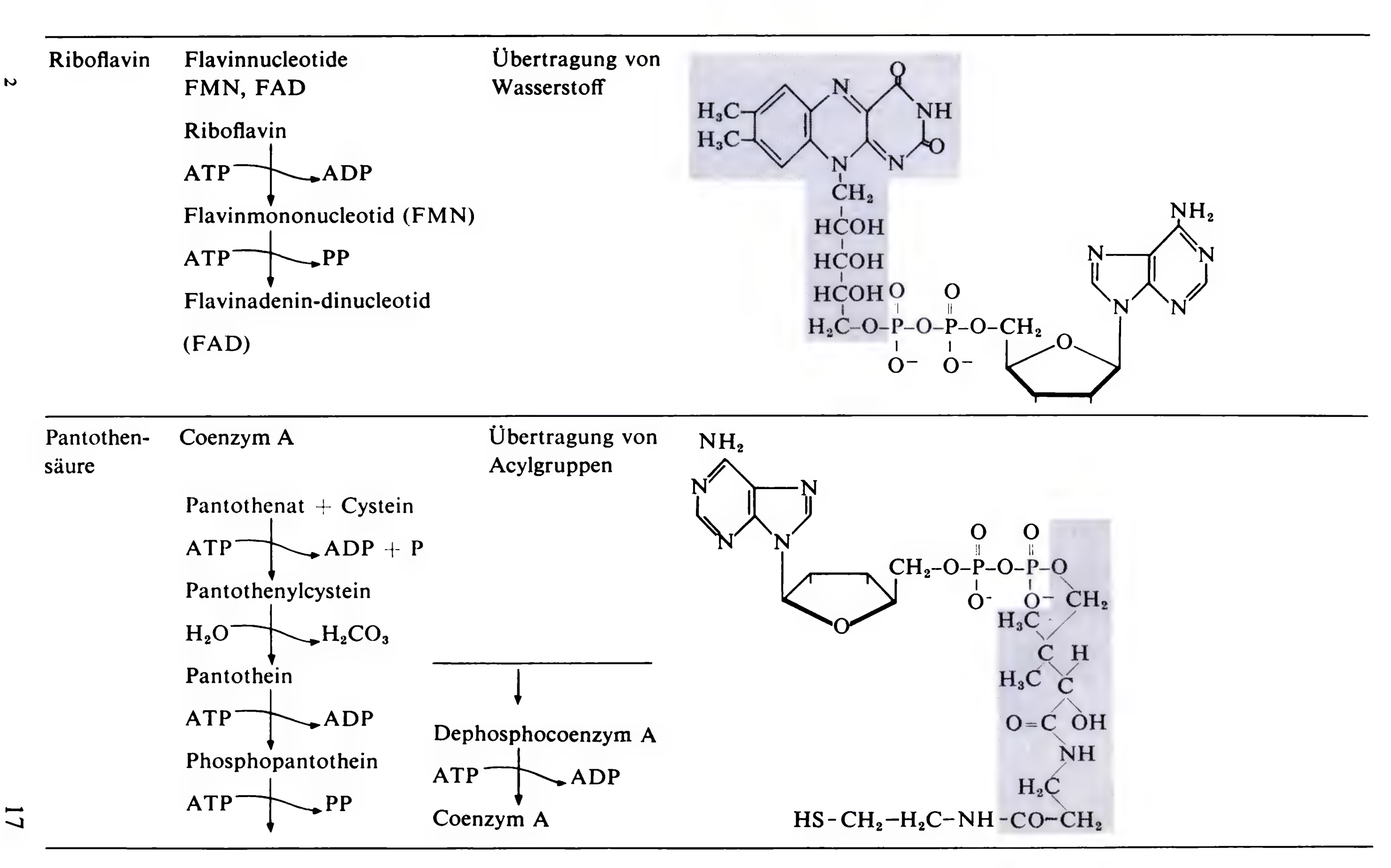
(S = Substrat; ES = Enzym-Substrat-Komplex; P = Reaktionsprodukt) Hieraus läßt sich ableiten, daß die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion (bei konstantem pH, konstanter Temperatur und konstanter Salzkonzentration) von folgenden Faktoren bestimmt wird: 1. Enzymkonzentration; 2. Substratkonzentration; 3. Geschwindigkeit, mit der ES zu E und P gespalten wird. Für eine gegebene Enzymmenge bedeutet dies, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit der *Substratkonzentration* variiert werden kann – aber nur bis zu einem gewissen Grade, denn es wird eine Substratkonzentration erreicht, bei der das Enzym mit Substrat gesättigt ist. Der Zustand der Substrat-Enzym-Sättigung ist im in-vitro-Versuch immer anzustreben, denn unter dieser Bedingung wird die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch von der Zerfallsrate von ES bestimmt und ist im Maximum (s. Abb. 1). Die Substrat-Enzym-Sättigung wird durch die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) definiert, wobei K_m numerisch gleich derjenigen Substratkonzentration (ausgedrückt in Mol/l) ist, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit beträgt. K_m ist eine für ein Enzym-Substrat-Paar charakteristische Größe.

Die Bindung des Substrats an das Enzym erfolgt durch bestimmte Gruppen im Enzymmolekül, die auch als «aktives Zentrum» bezeichnet werden. Hemmung einer Enzymreaktion wird beobachtet, wenn andere Substanzen als das Substrat eine Verbindung mit dem Enzym eingehen.

Tabelle 2. Die wichtigsten Coenzyme und ihre spezifischen Funktionen

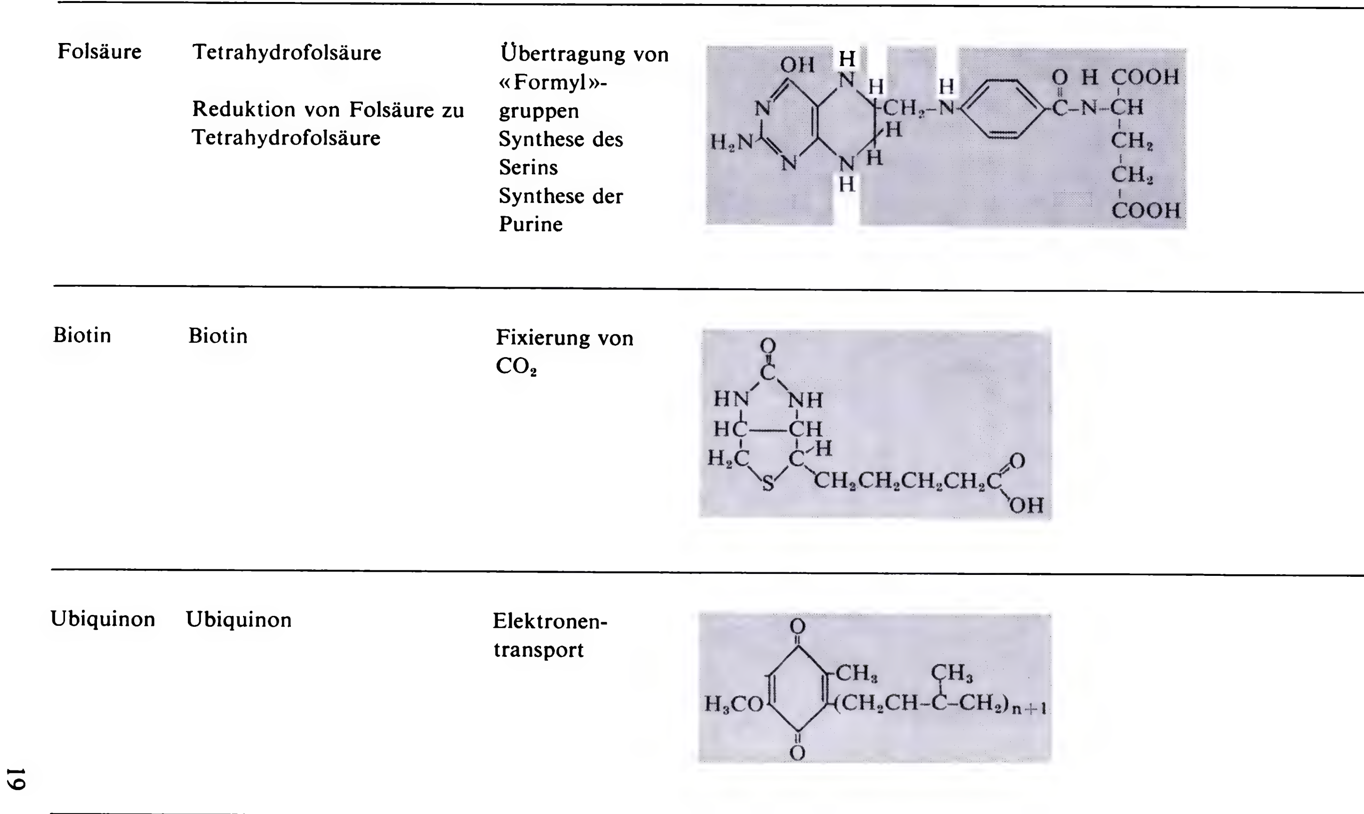
Vitamin	Coenzym und Biosynthese	Funktion	Formel
	Adenosinphosphate ATP, ADP, AMP	Übertragung von Phosphatgruppen	NH_2 … CH_2–O–P(=O)(O⁻)–O–P(=O)(O⁻)–O–P(=O)(O⁻)–OH
Nicotinsäure Nicotinamid	Nicotin-adenin-dinucleotide NAD, NADP Nicotinamid + Ribose-1-P ↓ Nicotinamidribosid + P ATP → ADP ↓ Nicotinamidmononucleotid ATP → PP ↓ NAD ATP → ADP ↓ NADP	Übertragung von Wasserstoff (R = Phosphat in NADP)	C(=O)–NH_2 … CH_2–O–P(=O)(O⁻)–O–P(=O)(O⁻)–O–CH_2 … R … NH_2

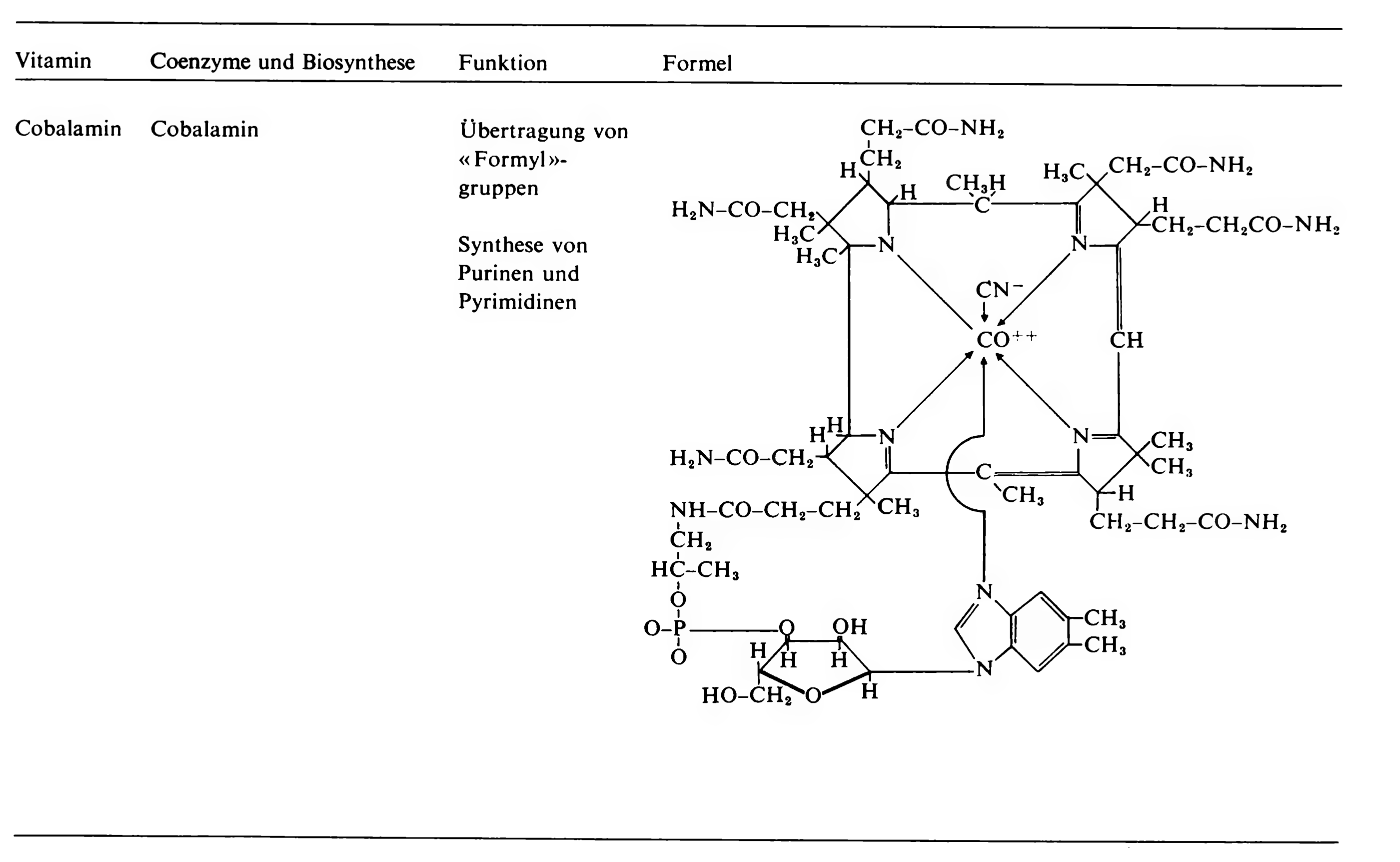
Riboflavin	Flavinnucleotide FMN, FAD Riboflavin ATP → ADP Flavinmononucleotid (FMN) ATP → PP Flavinadenin-dinucleotid (FAD)	Übertragung von Wasserstoff	
Pantothen-säure	Coenzym A Pantothenat + Cystein ATP → ADP + P Pantothenylcystein H_2O → H_2CO_3 Pantothein ATP → ADP Phosphopantothein ATP → PP	Übertragung von Acylgruppen Dephosphocoenzym A ATP → ADP Coenzym A	



Vitamin	Coenzym und Biosynthese	Funktion	Formel
Pyridoxin Pyridoxal	Pyridoxalphosphat Pyridoxal ATP → ADP Pyridoxalphosphat	Übertragung von Aminogruppen und Decarboxylierung von Aminosäuren	H O C; HO; H_3C; N; CH_2–O–P(=O)(O$^-$)–OH
Thiamin Aneurin	Thiaminpyrophosphat Thiamin ATP → AMP Thiaminpyrophosphat	Decarboxylierung von 2-Oxosäuren	NH_2; N; H_3C; N; CH_2–N; CH_3; S; CH_2–CH_2–O–P(=O)(O$^-$)–O–P(=O)(O$^-$)–OH
	Lipoinsäure	Übertragung von Wasserstoff bei oxydativer Decarboxylierung	H_2C; H_2C; S—S; $CHCH_2CH_2CH_2CH_2C$(=O)OH
	Uridindiphosphat	Isomerisierung von Hexosen	OH; N; O; N; O; CH_2–O–P(=O)(O$^-$)–O–P(=O)(O$^-$)–OH

Folsäure	Tetrahydrofolsäure Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolsäure	Übertragung von «Formyl»-gruppen Synthese des Serins Synthese der Purine	
Biotin	Biotin	Fixierung von CO_2	
Ubiquinon	Ubiquinon	Elektronen-transport	



Vitamin	Coenzyme und Biosynthese	Funktion	Formel
Cobalamin	Cobalamin	Übertragung von «Formyl»-gruppen Synthese von Purinen und Pyrimidinen	

Die Bindung des Inhibitors kann am «aktiven Zentrum» des Enzymmoleküls erfolgen, und Substrat und Inhibitor treten sozusagen in Konkurrenz um die Bindungsstelle. Es ist charakteristisch für diese sogenannte kompetitive Hemmung, daß Reaktivierung durch Erhöhung der Substratkonzentration erreicht wird. Je stärker die Affinität des Inhibitors zum Enzym, um so mehr Substrat ist nötig, um die Hemmung aufzuheben. Eine andere Art der Hemmung wird als nichtkompetitiv bezeichnet. Die Inaktivierung ist unabhängig von der Substratkonzentration. Man nimmt an, daß nichtkompetitive Inhibitoren nicht am «aktiven Zentrum» des Enzyms angreifen, sondern durch andere Gruppen im Enzymmolekül gebunden werden und – zum Beispiel durch intramolekulare Elektronenverschiebung – das aktive Zentrum beeinflussen.

Für Medizin und Pharmakologie sind Enzyminhibitoren von großer praktischer Bedeutung, nicht nur zur Erklärung von Vergiftungen, sondern auch für die Behandlung von Erkrankungen, entweder mit beabsichtigtem direktem Angriff an der Organzelle (z. B. Chemotherapie des Krebses) oder bei der Therapie bakterieller Erkrankungen durch Hemmung des Bakterienstoffwechsels mit Antibiotika.

COENZYME UND ANORGANISCHE KOMPLEMENTE

Coenzyme sind organische Substanzen, die in Verbindung mit einem oder mehreren Enzymen spezifische Funktionen ausüben. Einige sind Überträger für Wasserstoff oder für bestimmte chemische Gruppen. Sie haben ein niedriges Molekulargewicht (relativ zum Enzymprotein) und sind hitzestabil und *dialysierbar*. Die wichtigsten Coenzyme und ihre spezifischen Funktionen sind in Tabelle 2 aufgenommen. Coenzyme werden von menschlichen Organzellen synthetisiert, einigen dienen Vitamine der B-Gruppe als Bausteine. Dennoch ist es bisher nicht möglich, konkrete Beziehungen zwischen Vitaminmangelsymptomen und Coenzymfunktionen festzustellen.

Manche Coenzyme sind fest an das Enzymprotein gebunden, andere sind leicht dissoziierbar. Einige Autoren unterscheiden daher die festgebundenen «prosthetischen Gruppen» von den dissoziierenden eigentlichen Coenzymen. Im vorliegenden Text wird eine solche Unterscheidung nicht gemacht.

Anorganische Komplemente sind Salze oder Ionen, deren Anwesenheit für eine Enzymreaktion unbedingt erforderlich ist. Unter ihnen sind besonders die Spurenelemente zu nennen.

Der Substratumsatz wird gemessen entweder durch Bestimmung der Abnahme der eingesetzten Substratmenge oder durch Bestimmung der Zunahme eines Reaktionsproduktes. Die Ergebnisse einer Enzymaktivitätsbestimmung werden ausgedrückt in Menge Substrat umgesetzt pro Zeiteinheit pro Volumen Enzymlösung (oder bezogen auf Proteingehalt, Gehalt an Frisch- oder Trockengewicht des Organs usw. in der Enzymlösung). Leider sind in der Literatur und in der Praxis des klinischen Laboratoriums immer noch willkürlich gewählte Enzymeinheiten in Gebrauch, die einen Vergleich von Enzymaktivitäten sehr erschweren, wenn nicht unmöglich machen.

Die Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie hat in ihrem 1961 veröffentlichten Bericht folgende Standardisierung für Enzymeinheiten vorgeschlagen:

«Eine Enzymeinheit (U) entspricht der Menge an Enzym, welche die Umsetzung von einem Mikromol (µMol) Substrat pro Minute unter standardisierten Bedingungen katalysiert.»

Die Temperatur, bei welcher die Aktivitätsbestimmung ausgeführt wird, ist anzugeben und sollte, wenn möglich, 25 °C betragen, da dann die Akti-

Tabelle 3. Umrechnung von gebräuchlichen Enzymeinheiten in Internationale Einheiten
Eine Internationale Enzymeinheit ist definiert als diejenige Enzymmenge, die 1 µMol Substrat pro Minute bei 25 °C umsetzt. Für Bestimmungen in Körperflüssigkeiten bedient man sich der Millieinheit pro ml. 1 mU = 1 mµMol/min × ml.

Enzyme	Einheiten nach	Faktor zur Umrechnung in mU
NAD- und NADP-abhängige Enzymreaktionen	Wroblewski	0,48
	Bücher	18,2
	Amelung-Horn	16,7
	Holzer	0,91
Saure Phosphatase[1]	King-Armstrong	1,8
	Lowry-Bessey	16,7
Alkalische Phosphatase[1]	King-Armstrong	7,1
	Bodansky	5,35
	Lowry-Bessey	16,7

[1] gemessen bei 37 °C.

vitäten verschiedener Enzyme ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Bei 25 °C ist die Aktivität der meisten Enzyme groß genug, um bestimmt werden zu können, und treten Hitzeinaktivierungserscheinungen meistens noch nicht auf. Wenn irgend möglich sollen optimale Bedingungen, insbesondere in bezug auf pH und Substratkonzentration, eingehalten werden.

Es ist zu hoffen, daß sich die Empfehlung der Enzymkommission rasch durchsetzen wird. Von klinisch-chemischen Laboratorien, wo sich der Übergang von «althergebrachten» Enzymeinheiten zu den neuen Einheiten nur langsam vollziehen wird (weil der Arzt am Krankenbett solche Änderungen erfahrungsgemäß nicht so schnell akzeptiert), sollte wenigstens ein Umrechnungsfaktor angegeben werden, der die Übertragung der alten Einheiten in μMol pro Minute gestattet. Das gleiche gilt natürlich für Publikationen, in denen zu Vergleichszwecken die alten Einheiten noch gebraucht werden (s. Tab. 3, Umrechnungsfaktoren).

ENZYMAKTIVITÄTEN, IN VITRO VERSUS IN VIVO

Es ist praktisch unmöglich, die *Menge* eines Enzyms in einem Organ oder in einer Körperflüssigkeit zu bestimmen. Dazu wäre es nämlich notwendig, das entsprechende Enzym in absolut reiner Form quantitativ zu isolieren. Ganz abgesehen davon, daß die Isolierung und Reindarstellung sehr zeitaufwendig ist, entstehen bei den bekannten Isolierungsverfahren immer mehr oder weniger große Verluste an Enzymproteinen, so daß man nicht zu den gewünschten quantitativen Ergebnissen gelangt. Sehr viel einfacher und in vielen Fällen leicht und schnell durchführbar ist dagegen die Bestimmung der *Aktivität* eines Enzyms.

Aktivitätsbestimmungen müssen unter genau standardisierten Bedingungen durchgeführt werden. Enzyme wirken im Reagenzglas in einem künstlich geschaffenen Milieu, das beträchtlich von den Bedingungen in vivo abweicht (s. hierzu auch Seite 59). Es ist demnach nur in wenigen Ausnahmefällen möglich, die in vitro gemessenen Enzymaktivitäten annäherungsweise mit in vivo ablaufenden Stoffwechselvorgängen in quantitative Beziehungen zu setzen. Unsere Kenntnisse über die intrazelluläre Regulation von Enzymreaktionen ist noch sehr gering. Man ist bestrebt, im Reagenzglas *optimale* Reaktionsbedingungen zu schaffen und somit das Aktivitäts-*Potential* eines Enzyms zu bestimmen.

Wenn nun Enzymaktivitäten zu diagnostischen Zwecken in Organextrakten und Körperflüssigkeiten gemessen werden, so wird festgestellt,

ob die unter optimalen und standardisierten Versuchsbedingungen erhaltenen Ergebnisse von den an gesunden Versuchspersonen erhaltenen «Normalwerten» abweichen. Enzyme im Blutserum, Enzyme in einzelnen Organen und besonders Enzyme im Urin bedürfen hier einer gesonderten Betrachtung.

Enzyme im Blutserum werden so bestimmt, daß man Serum unter bestimmten Kautelen gewinnt und dann direkt dem Inkubationsmedium zusetzt. Es wird hierbei stillschweigend vorausgesetzt, daß im Blutserum keine Inhibitoren für das zu bestimmende Enzym vorkommen oder, weniger wahrscheinlich, daß eventuell vorkommende Inhibitoren immer in gleicher Konzentration vorliegen und die Enzymaktivität immer gleich beeinflussen.

Anders ist es bei Enzymbestimmungen in Gewebeproben. Man bereitet Homogenate oder Extrakte. Da die Aktivität der meisten Enzyme in vielen Organen wesentlich höher ist als im Serum, müssen die Homogenate oder Extrakte entsprechend verdünnt werden. Damit werden Inhibitoren, wenn sie in den Organzellen normalerweise oder pathologischerweise vorkommen, so verdünnt, daß ihre Hemmwirkung aufgehoben wird.

Hierzu zwei Beispiele: Das Enzym Kohlensäure-anhydrase (CA) bildet aus CO_2 und H_2O Kohlensäure, die wiederum in Wasserstoffionen und Bicarbonationen dissoziiert. Mit anderen Worten katalysiert CA die Bildung von Wasserstoffionen. In der Niere, die reich an CA ist, werden Wasserstoffionen für die Rückresorption von Bicarbonat und zur Ansäuerung des Urins gebildet und ausgeschieden (Regulation des Säure-Basen-Gleichgewichts). Bestimmte Sulfonamidderivate (z.B. Acetazolamid oder Diamox) sind starke Inhibitoren der CA. Gibt man einem Versuchstier Diamox, so wird im Urin als Folge der CA-Hemmung Bicarbonat ausgeschieden und bleibt das pH des Urins selbst bei Säurebelastung neutral. Bestimmt man nun im Nierengewebe die CA, so findet man normale Aktivität. Die Aktivität der CA ist in der Niere so hoch, daß eine vieltausendfache Verdünnung des Nierenhomogenats notwendig ist, um die CA-Aktivität messen zu können. Dadurch wird der Inhibitor zur unwirksamen Konzentration verdünnt.

Beim Krankheitsbild der renalen tubulären Azidose wird ebenfalls ein bicarbonathaltiger, neutraler Urin ausgeschieden, und man nimmt eine Unterfunktion der CA in der Niere an. Aber wiederum wurden bei Untersuchungen im Laboratorium des Verfassers normale Aktivitäten der CA in allen Abschnitten des Nephrons gefunden. Aus diesem Ergebnis ist zu folgern, daß beim Krankheitsbild der renalen tubulären Azidose das

Aktivitätspotential der CA nicht herabgesetzt ist. Ob und wodurch das Enzym in vivo gehemmt wird, ist unbekannt (s. hierzu das Kapitel Niere).

Die beiden Beispiele machen deutlich, welchen Einfluß das «Arbeitsklima» auf die Aktivität eines Enzyms hat. In vivo ist die Aktivität der CA gehemmt, während im Reagenzglas uneingeschränkte Aktivität gefunden wird.

Bis vor kurzer Zeit wurden Enzyme im Urin zu diagnostischen Zwecken nur gelegentlich bestimmt. Im Vordergrund stand die Amylase, deren Aktivität bei Pankreaserkrankungen im Urin erhöht gefunden wird. Neuerdings hat sich die Bestimmung der alkalischen Phosphatase und der Lactatdehydrogenase im Urin als äußerst wertvoll für die Diagnose von Karzinomen der Niere und der ableitenden Harnwege (W. E. WACKER) erwiesen.

Nun ist der Urin einerseits sehr reich an Enzyminhibitoren, und andererseits sind die Aktivitäten der bisher untersuchten Enzyme im Urin relativ gering. Eine stärkere Verdünnung, durch welche die Inhibitoren ausgeschaltet werden, ist nicht möglich. Es ist daher notwendig, den Urin vor Durchführung der Enzymbestimmung zu dialysieren. Im Fall der alkalischen Phosphatase und der Lactat-dehydrogenase scheint die quantitative Entfernung der Inhibitoren zu gelingen. Bei Versuchen, im Laboratorium des Verfassers kleinste Hämoglobinmengen im Urin mit Hilfe der Peroxydasewirkung des Hämoglobins zu bestimmen, wurde festgestellt, daß für dieses Enzym und auch für andere Peroxydasen nichtdialysierbare Inhibitoren im Urin vorkommen.

Enzymbestimmungen im Urin setzen also voraus, daß natürlich vorkommende Inhibitoren entfernt werden. Welche Enzyme außer den genannten für den Arzt von Interesse sind, müssen zukünftige Untersuchungen ergeben. Es bleibt auch abzuwarten, ob es gelingen wird, die entsprechenden Inhibitoren zu entfernen.

NOMENKLATUR UND KLASSIFIZIERUNG DER ENZYME

Enzyme sind reaktionsspezifisch und substratspezifisch. Unter Reaktionsspezifität versteht man die Spezifität bezüglich der Wirkungsweise. Esterspaltende Enzyme zum Beispiel hydrolysieren nur Esterbindungen, wasserstoffübertragende Enzyme übertragen nur Wasserstoff. Die Substratspezifität ist durch die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat bedingt: sie kann absolut sein, wenn nur ein einziges Substrat angegriffen wird, oder sie kann relativ sein, wenn neben dem eigentlichen Substrat noch andere, dem Substrat verwandte Verbindungen umgesetzt werden.

Die Nomenklatur der Enzyme ist nicht einheitlich, viele Synonyme sind in Gebrauch. Im allgemeinen wird ein Enzym durch Anhängen der Silbe «-ase» an das Substrat bezeichnet. 1961 hat nun die Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie einen systematischen Klassifizierungs- und Nomenklaturvorschlag veröffentlicht, der hoffentlich zu einer einheitlichen Benennung der Enzyme führen wird. Jedes Enzym erhält einen systematischen Namen, der so kurz aber genau wie möglich den Reaktionsvorgang beschreibt. Daneben werden einheitliche kurze Trivialnamen vorgeschlagen. Hier einige Beispiele:

Das Enzym, das Phosphat von ATP auf Pyruvat überträgt

$$\text{ATP} + \text{Pyruvat} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{Phospho-enol-pyruvat}$$

wird systematisch als *ATP: Pyruvat phosphotransferase* bezeichnet. Nach den von der Enzymkommission aufgestellten Regeln wird bei gruppenübertragenden Enzymen (Transferasen) der Gruppendonor zuerst genannt. Es folgt, durch einen Doppelpunkt getrennt, die Rezeptorsubstanz, gefolgt von der übertragenen Gruppe mit der Endung «-transferase». Der Trivialname ist Pyruvat-kinase. Die Reaktion

$$\text{L-Malat} + \text{NAD} \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{NADH}_2$$

wird von dem Enzym *L-Malat: NAD Oxydoreductase* (Trivialname Malatdehydrogenase) katalysiert. Das Enzym gehört zur Gruppe der Oxydoreductasen. In der systematischen Bezeichnung wird die oxydierte Verbindung zuerst genannt, gefolgt von der in der Reaktion reduzierten Verbindung. Die etwa 700 bisher bekannt gewordenen Enzyme werden in 6 Gruppen eingeteilt:

1. Oxydoreductasen
2. Transferasen
3. Hydrolasen
4. Lyasen
5. Isomerasen
6. Ligasen (Synthetasen)

Für 1 und 2 wurden oben Beispiele gegeben. Hydrolasen sind Enzyme, die Verbindungen unter Einlagerung von H_2O spalten.

Beispiel: *β-D-Glucosid glucohydrolase* (Trivialname β-Glucosidase) katalysiert die Reaktion

$$\beta\text{-D-Glucosid} + H_2O \rightarrow \text{D-Glucose} + \text{ein Alkohol}$$

Lyasen spalten Verbindungen nicht hydrolytisch.

Beispiel: *L-Tyrosin carboxy-lyase* (Trivialname Tyrosin-decarboxylase) katalysiert die Reaktion

$$\text{L-Tyrosin} \rightarrow \text{Tyramin} + CO_2$$

Isomerasen führen eine Verbindung in ein Isomeres über. Der Typ der Isomerisierung wird als Präfix bezeichnet. Racemase, Epimerase, Mutase, Cis-trans-isomerase.

Beispiel: *D-Ribose-5-phosphat ketol-isomerase* (Trivialname Ribosephosphat-isomerase) katalysiert die Reaktion

$$\text{D-Ribose-5-phosphat} \rightarrow \text{D-Ribulose-5-phosphat}$$

Das Präfix «ketol» bezeichnet die Umwandlung eines Aldols in ein Ketol. Ligasen katalysieren Synthesereaktionen, die mit der gleichzeitigen Aufspaltung von ATP zu AMP und PP_i oder ATP zu ADP und P_i verbunden sind.

Beispiel: *L-Glutamat: Ammonia-ligase (ADP)* (Trivialname Glutaminsynthetase) katalysiert die Reaktion

$$\text{ATP} + \text{L-Glutamat} + NH_3 \rightarrow \text{ADP} + P_i + \text{L-Glutamin}$$

ADP in Klammern hinter dem systematischen Namen weist darauf hin, daß ATP zu ADP gespalten wird.

Im Text dieses Buches werden die vorgeschlagenen Trivialnamen verwendet. In den Stoffwechselschemata ist die dem Vorschlag der Enzymkommission gemäße Klassifizierungsnummer in eckige Klammern gesetzt.

NOMENKLATUR DER COENZYME

Die Codehydrogenasen I und II haben neue Bezeichnungen erhalten. Die alte und die neue Terminologie sind hier zusammengestellt.

Alte Bezeichnung	Neue Bezeichnung
Codehydrogenase I oder Diphosphopyridin-nucleotid oder DPN	Nicotinamid-adenin-dinucleotid oder NAD
Codehydrogenase II oder Triphosphopyridin-nucleotid oder TPN	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat oder NADP
Reduzierte Formen	
$DPNH_2$ oder $DPNH + H^+$	$NADH_2$ oder $NADH + H^+$
$TPNH_2$ oder $TPNH + H^+$	$NADPH_2$ oder $NADPH + H^+$

Die Bezeichnungen für die Flavincoenzyme, Flavinmono-nucleotid (FMN) und Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) sind beibehalten worden. Die Enzymkommission hat weiter vorgeschlagen, die Bezeichnung Coenzym Q zu streichen und dafür den Namen «Ubiquinon» oder in der Abkürzung «UQ» zu benutzen. An der Bezeichnung Coenzym A oder CoA oder CoASH hat sich nichts geändert.

ISOENZYME

Für eine Reihe von Enzymen sind mehr als eine molekulare Form mit der gleichen Wirkungs- und Substratspezifität aufgefunden worden – man nennt diese multiplen molekularen Formen eines Enzyms Isoenzyme. Sie werden unter den Hydrolasen (alkalische und saure Phosphatase, Amylase, Aminopeptidase), Oxydoreductasen (Lactat-dehydrogenase, Malat-dehydrogenase) und Transferasen (Aminotransferasen) – um nur einige Beispiele für jede Gruppe zu nennen – gefunden.

Nach anfänglichen Zweifeln, ob es sich nicht um Artefakte bei der Aufarbeitung und Trennung der Enzyme handelt, steht heute fest, daß viele Enzyme in multiplen molekularen Formen existieren. Die Trennung wird mittels Elektrophorese auf Stärkegel, Zelluloseacetatpapier oder bestimmten Chromatographiesäulen erreicht. Der Nachweis der Enzyme auf den Trägern geschieht mit den in der Histochemie gebräuchlichen Methoden. Die Dehydrogenasen zum Beispiel werden mit der Tetrazoliummethode angefärbt (s. Seite 61).

Am eingehendsten untersucht sind die LDH-Isoenzyme. Im menschlichen Blutplasma und in Organextrakten lassen sich 5 LDH-Isoenzyme mit

Tabelle 4. Isoenzyme der Lactat-dehydrogenase im Blutplasma und in einigen Organen des Menschen. Angaben in % der Gesamtaktivität

	LDH-Isoenzyme				
	1	2	3	4	5
Plasma	23	48	19	8	3
Herzmuskel	35	26	12	16	11
Leber	2	4	11	27	56
Niere	12	14	24	25	23
Skelettmuskel	4	7	21	27	41

(Nach R.J. Wieme und Y. Van Maercke: Ann. N.Y. Acad. of Sci. Vol. *94*, Art. 3, 1961.)

charakteristischen Verteilungsmustern für jedes Organ nachweisen. 3 der Isoenzyme wandern bei der Elektrophorese zur Anode und werden mit abnehmender Wanderungsgeschwindigkeit als 1, 2 und 3 bezeichnet. LDH-4 und LDH-5 wandern zur Kathode. (Bis vor kurzem wurde in der europäischen Literatur eine umgekehrte Reihenfolge in der Bezeichnung benutzt, wobei das am schnellsten zur Anode wandernde Isoenzym als LDH-5 bezeichnet wurde!)

In Tabelle 4 sind die LDH-Isoenzymmuster im Serum und einigen Organextrakten verglichen. Besonders auffallend ist der Unterschied zwischen Herzmuskel und Leber. Hieraus ergeben sich diagnostische Möglichkeiten. Beim Herzinfarkt zum Beispiel tritt LDH ins Blut über, und entsprechend dem LDH-Isoenzymmuster werden Anstiege in LDH-1 und LDH-2 gefunden. Bei Lebererkrankungen steigen dagegen LDH-4 und LDH-5 im Plasma an. Auf weitere diagnostische Möglichkeiten mit Isoenzymen wird im Kapitel über Enzyme im Blutplasma eingegangen.

LITERATUR

M. Dixon und E. C. Webb: Enzymes. Academic Press, New York 1958.

K. Myrbäck: Enzymatische Katalyse. Walter De Gruyter & Co., Berlin 1953.

Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry 1961. Pergamon Press, New York, Oxford, London, Paris 1961.

J. B. Neilands und P. K. Stumpf: Outlines of Enzyme Chemistry. 2. Auflage. John Wiley and Sons, New York 1962.

S. H. Lawrence: The Zymogram in Clinical Medicine. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A. 1964.

Multiple Molecular Forms of Enzymes. F. Wroblewski, Editor, Annals of the New York Academy of Sciences *94*, Art. 3, 1961.

HAUPTWEGE
DES INTERMEDIÄREN STOFFWECHSELS

Nahrungsstoffe werden im Stoffwechsel in drei Phasen abgebaut. In der ersten Phase werden größere Moleküle in kleinere zerlegt, Kohlenhydrate in Hexosen, Proteine in Aminosäuren, Fette in Glycerol und Fettsäuren. In der zweiten Phase wird aus Hexosen, Glycerol, Fettsäuren und einigen Aminosäuren Acetyl-CoA gebildet, aus anderen Aminosäuren Succinat, Fumarat, 2-Oxoglutarat und Oxalacetat (Tab. 5). In der dritten Phase werden diese Verbindungen zu CO_2 und H_2O oxydiert.

Tabelle 5. Verbindungen, aus denen im Stoffwechsel Acetyl-CoA und/oder Komponenten des Citrat-Zyklus entstehen

Acetyl-CoA	Succinat	Fumarat	2-Oxoglutarat	Oxalacetat
↑	↑		↑	↑
Hexosen	Valin		Glutamat	Aspartat
Fettsäuren	Aminobutyrat		Histidin	
Glycerin	Homoserin		Arginin	
Alanin	Homocystein		Ornithin	
Cystein/Cystin	Methionin		Citrullin	
Serin			Prolin	
Leucin			Oxyprolin	
Isoleucin	↑			
Glycin				
Threonin				
Lysin			↑	
Phenylalanin		↑		
Tyrosin		↑		
Tryptophan				

Rund $^1/_3$ der in den Nahrungsstoffen gespeicherten Energie wird in der zweiten Phase und $^2/_3$ in der dritten Phase verfügbar gemacht. Jeder Organismus, von den einzelligen Lebewesen angefangen, bedient sich dabei des Mechanismus der Energieübertragung auf Adenosintriphosphat (ATP). Im ATP sind die beiden Phosphorsäureanhydrid-Bindungen energiereich (~).

$$\text{Adenosin–P}{\sim}\text{P}{\sim}\text{P}$$

ATP wird bei der Glycolyse und bei der Oxydation des Wasserstoffs in der Elektronentransportkette gebildet.

Durch ATP wird die Energie für energieverbrauchende Reaktionen, wie biochemische Synthesen, Muskelkontraktion, osmotische Arbeit, Wärmebildung usw., übertragen. Die chemische Energie der Phosphorsäureanhydrid-Bindung im ATP kann direkt durch Hydrolyse in mechanische Energie umgesetzt werden, zum Beispiel bei der Muskelkontraktion

$$\text{ATP} \xrightarrow{\text{(Myosin)}} \text{ADP} + \text{P}$$

oder sie kann durch Bildung anderer energiereicher Bindungen übertragen werden, zum Beispiel bei der Bildung von Creatin-phosphat im Muskel

$$\text{Creatin} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{(Creatinkinase)}} \text{Creatin}{\sim}\text{P} + \text{ADP}$$

Viele Stoffwechselreaktionen verlaufen nur, wenn sich das Substrat im «aktivierten» Zustand befindet. Fettsäuren werden zum Beispiel nur in Form ihrer Coenzym-A-Derivate oxydiert oder synthetisiert. Die Acylmerkaptan-Bindung ist energiereich und wird mit Hilfe von ATP gebildet

$$\underset{\text{(Fettsäure)}}{\text{R–}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}\text{–OH}} + \text{ATP} + \text{HS–CoA} \rightarrow \underset{\text{(Acyl-CoA)}}{\text{R–}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}{\sim}\text{S–CoA}} + \text{AMP} + \text{PP}$$

Zur Proteinsynthese müssen Aminosäuren aktiviert werden. Die aktivierte Form der Aminosäuren ist das Aminoacyl-adenosinmonophosphat

$$\underset{\text{(Aminosäure)}}{\text{R–}\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{–}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}\text{–OH}} + \text{ATP} \rightarrow \underset{\text{(Aminoacyl-AMP)}}{\text{R–}\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{–}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}{\sim}\text{O–}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}^-}{\text{P}}}\text{–O–Adenosin}} + \text{PP}$$

Die Hauptwege des intermediären Stoffwechsels sind im folgenden schematisch dargestellt und kurz besprochen.

GLYCOLYSE
(Abb. 2)

Die Glycolyse wird durch ein Multi-Enzymsystem katalysiert, das Glucose anaerob zu Pyruvat abbaut. Die Netto-Reaktion lautet:

$$\text{Glucose} + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{P} + 2\,\text{NAD} \rightarrow 2\,\text{Pyruvat} + 2\,\text{ATP} + 2\,\text{NADH}_2$$

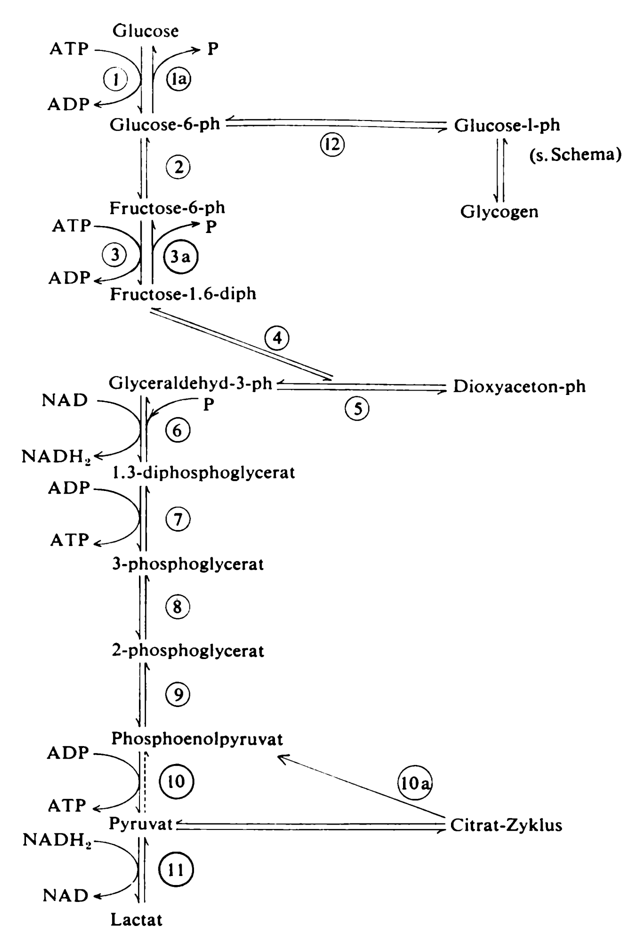


Abb. 2. Schema der Glycolyse.
Enzymreaktionen:

1. Glucokinase [2.7.1.1]
   ATP + D-Glucose → ADP + D-Glucose-6-ph

1a. Glucose-6-phosphatase [3.1.3.9]
   D-Glucose-6-ph → D-Glucose + P

2. Glucosephosphat-isomerase [5.3.1.9]
   D-Glucose-6-ph ⇌ D-Fructose-6-ph

3. Phosphofructokinase [2.7.1.11]
   ATP + D-Fructose-6-ph → ADP + D-Fructose-1.6-diph

3a. Hexose-diphosphatase [3.1.3.11]
   D-Fructose-1.6-diph → D-Fructose-6-ph + P

4. Aldolase [4.1.2.13]
   D-Fructose-1.6-diph ⇌ D-Glyceraldehyd-3-ph + Dioxyaceton-ph

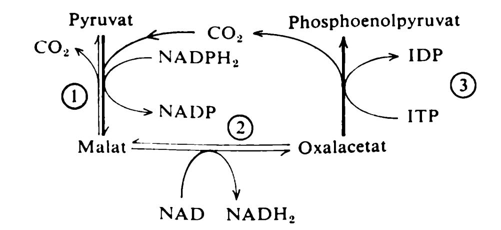


Abb. 3. Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat.
Enzymreaktionen:

1. Malat-dehydrogenase (decarboxylierend) [1.1.1.40]
   Pyruvat + CO_2 + $NADPH_2$ $\rightleftharpoons$ L-Malat + NADP
2. Malat-dehydrogenase [1.1.1.37]
   Malat + NAD $\rightleftharpoons$ Oxalacetat + $NADH_2$
3. Phosphoenolpyruvat-carboxylyase [4.1.1.32]
   ITP + Oxalacetat $\rightarrow$ Phosphoenolpyruvat + CO_2 + IDP

Die Glycolyse ist reversibel, das heißt, aus Pyruvat kann Glucose oder Glycogen resynthetisiert werden. Aus energetischen Gründen sind einige der Enzymreaktionen nicht umkehrbar, und die Rückreaktion wird durch andere Enzyme katalysiert. Nicht umkehrbar sind: Pyruvatkinase-, Phosphofructokinase- und Hexokinasereaktion.

Um aus Pyruvat wieder Phosphoenolpyruvat zu bilden, würde in der Kinasereaktion eine sehr hohe ATP-Konzentration notwendig sein. Es wurde aber ein Reaktionsmechanismus entdeckt, mit dem Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat via Malat und Oxalacetat synthetisiert werden kann (Abb. 3). Jedes andere Substrat, aus dem im intermediären Stoffwechsel

---

5. Triosephosphat-isomerase [5.3.1.1]
   D-Glyceraldehyd-3-ph $\rightleftharpoons$ Dioxyaceton-ph
6. Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase [1.2.1.12]
   D-Glyceraldehyd-3-ph + NAD + P $\rightleftharpoons$ 1.3-Diphosphoglycerat + $NADH_2$
7. Phosphoglycerat-kinase [2.7.2.3]
   ADP + 1.3-Diphosphoglycerat $\rightleftharpoons$ ATP + 3-Phosphoglycerat
8. Phosphoglycerat-phosphomutase [5.4.2.1]
   3-Phospho-D-glycerat $\rightleftharpoons$ 2-Phospho-D-glycerat
9. Phosphopyruvat-hydratase [4.2.1.11]
   2-Phospho-D-glycerat $\rightleftharpoons$ Phosphoenolpyruvat + H_2O
10. Pyruvat-kinase [2.7.1.40]
    ADP + Phosphoenolpyruvat $\rightarrow$ ATP + Pyruvat

10a. Phosphopyruvat-carboxylyase [4.1.1.32]
    ITP + Oxalacetat $\rightarrow$ Phosphoenol-pyruvat + CO_2 + IDP (s. Abb. 3)

11. Lactat-dehydrogenase [1.1.1.28]
    Pyruvat + $NADH_2$ $\rightleftharpoons$ Lactat + NAD

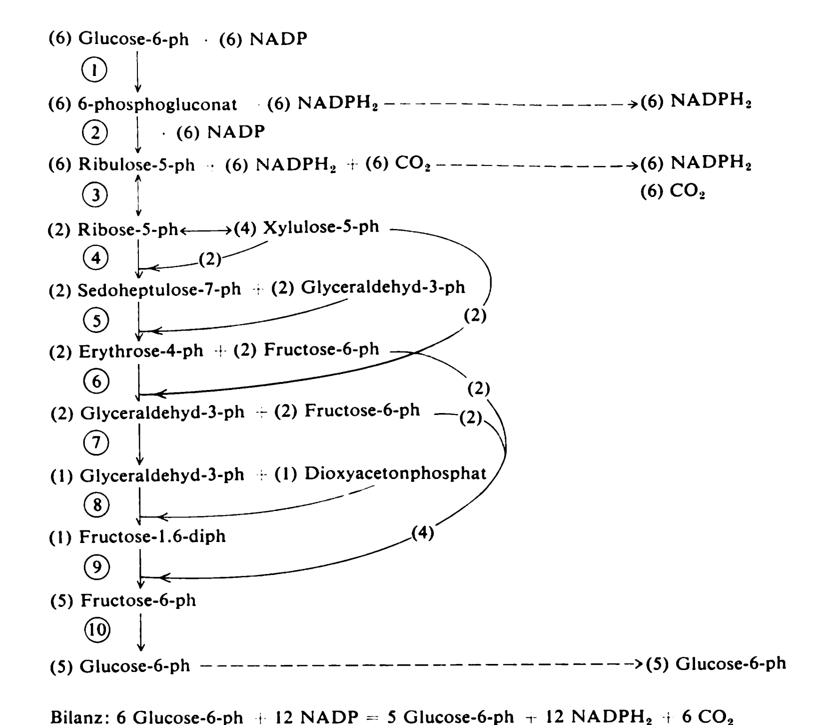


Abb. 4. Glucosemonophosphat-Shunt.

Enzymreaktionen (die Nummern entsprechen den Zahlen in den Kreisen):

1. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase [1.1.1.49]
   Glucose-6-ph + NADP → 6-phosphogluconat + $NADPH_2$
2. Phosphogluconat-dehydrogenase (decarboxylierend) [1.1.1.44]
   6-phosphogluconat + NADP → Ribulose-5-ph + $NADPH_2$ + CO_2
3. Ribose-phosphat-isomerase [5.3.1.6]
   Ribulose-5-ph ⇌ Ribose-5-ph
   Ribulose-phosphat-epimerase [5.1.3.1]
   Ribulose-5-ph ⇌ Xylulose-5-ph
4. Transketolase (Glycolaldehyd-transferase) [2.2.1.1]
   Xylulose-5-ph + Ribose-5-ph ⇌ Sedoheptulose-7-ph + Glyceraldehyd-3-ph
   Einzelheiten s. Abb. 5
5. Transaldolase (Dihydroxyaceton-transferase) [2.2.1.2]
   Sedoheptulose-7-ph + Glyceraldehyd-3-ph ⇌ Erythrose-4-ph + Fructose-6-ph
   Einzelheiten s. Abb. 5
6. Transketolase (Glycolaldehyd-transferase) [2.2.1.1]
   Xylulose-5-ph + Erythrose-4-ph ⇌ Fructose-6-ph + Glyceraldehyd-3-ph
   Einzelheiten s. Abb. 5
7. Triosephosphat-isomerase [5.3.1.1]
   Glyceraldehyd-3-ph ⇌ Dioxyaceton-ph

```
                                          CH2OH
                                            |
                                           C=O
CH2OH          H-C=O                     HO-C-H
  |              |                          |
 C=O           H-C-OH                     H-C-OH
HO-C-H         H-C-OH  <=============>    H-C-OH          O=C-H
  |              |                          |               |
H-C-OH         H-C-OH                     H-C-OH          H-C-OH
  |              |                          |               |
H2C-O-P        H2C-O-P                    H2C-O-P         H2C-O-P
 C5      +       C5                         C7       +      C3
```

Transketolasereaktion (Glycolaldehyd-transferase)
Xylulose-5-ph + Ribose-5-ph ⇌ Sedoheptulose-7-ph + Glyceraldehyd-3-ph

```
CH2OH
  |
 C=O                                      CH2OH
  |                                         |
HO-C-H                                     C=O
  |                                         |
H-C-OH                                    HO-C-H          H-C=O
  |                                         |               |
H-C-OH         H-C=O   <=============>    H-C-OH          H-C-OH
  |              |                          |               |
H-C-OH         H-C-OH                     H-C-OH          H-C-OH
  |              |                          |               |
H2C-O-P        H2C-O-P                    H2C-O-P         H2C-O-P
 C7      +       C3                         C6              C4
```

Transaldolasereaktion (Dioxyaceton-transferase)
Sedoheptulose-7-ph + Glyceraldehyd-3-ph ⇌ Erythrose-4-ph + Fructose-6-ph

```
                                          CH2OH
                                            |
CH2OH                                      C=O
  |                                         |
 C=O           H-C=O                      HO-C-H
  |              |                          |
HO-C-H         H-C-OH  <=============>    H-C-OH          H-C=O
  |              |                          |               |
H-C-OH         H-C-OH                     H-C-OH          H-C-OH
  |              |                          |               |
H2C-O-P        H2C-O-P                    H2C-O-P         H2C-O-P
 C5      +       C4                         C6       +      C3
```

Transketolasereaktion (Glycolaldehyd-transferase)
Xylulose-5-ph + Erythrose-4-ph ⇌ Fructose-6-ph + Glyceraldehyd-3-ph

Abb. 5. Formeldarstellung der Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen im Glucosemonophosphat-Shunt (Abb. 4).

Pyruvat oder eine Verbindung des Citrat-Zyklus entsteht, kann auf diesem Wege zu Glucose synthetisiert werden (Gluconeogenese zum Beispiel aus glucogenen Aminosäuren). Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat zu Lactat reduziert, um NAD für die Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase-Reaktion zu regenerieren.

---

8. Aldolase [4.1.2.7]
   Dioxyaceton-ph + Glyceraldehyd-3-ph ⇌ Fructose-1.6-diph
9. Hexose-diphosphatase [3.1.3.11]
   Fructose-1.6-diph → Fructose-6-ph + P
10. Glucosephosphat-isomerase [5.3.1.9]
   Fructose-6-ph ⇌ Glucose-6-ph

Die am Anfang der Glycolyse stehenden Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase sind in der Gluconeogenese durch Phosphatasen ersetzt. Die Gluconeogenese findet anscheinend nur in der Leber statt. Im Muskel fehlen die beiden Phosphatasen. MEYERHOF hatte früher gefunden, daß im Froschmuskel bis zu 80% des aus Glycogen gebildeten Lactats wieder zu Glycogen resynthetisiert wird. Auf den Säugetiermuskel trifft das nicht zu. Gebildete Milchsäure wird vielmehr ans Blut abgegeben und in der Leber zu Glycogen umgewandelt. Dem Muskel wird dann erneut Glucose zugeführt, die zur Glycogensynthese verwandt wird.

Der Stoffwechsel von Glycogen, Fructose und Galactose ist an anderer Stelle besprochen (Glycogen Abb. 22, S. 90, Fructose Abb. 25, S. 96, Galactose Abb. 24, S. 95).

GLUCOSEMONOPHOSPHAT-SHUNT
(Abb. 4)

Neben der Glycolyse existiert ein weiterer Abbauweg für Glucose, der Glucosemonophosphat-Shunt. Der Shunt ist ein komplexer Mechanismus, der verschiedene Aufgaben erfüllt.

1. Glucose kann vollständig zu CO_2 oxydiert werden. Der eigentliche Oxydationsvorgang spielt sich nur in den Reaktionen 1 und 2 ab. Geht man von der Bilanz aus (Abb. 4), so entstehen 6 CO_2 und 12 $NADPH_2$ aus 6 Glucose-6-phosphat. CO_2 entstammt ausschließlich dem C_1 der Glucose. Zur vollständigen Oxydation der Glucose müssen die verbleibenden 6 Ribulose-5-phosphat in 5 Moleküle Glucose-6-phosphat zurückverwandelt werden. Die hierbei ablaufenden Transaldolase- und Transketolase-Reaktionen sind in Abbildung 5 dargestellt. Das gebildete Glucose-6-phosphat durchläuft den Shunt wiederholt, bis alle 6 C-Atome zu CO_2 oxydiert sind.
2. Gebildete Pentose-phosphate dienen zur Synthese von Nucleotiden, die wiederum Bausteine von Nucleinsäuren und von Coenzymen sind.
3. Das gebildete $NADPH_2$ dient zur Synthese von Fettsäuren und Steroidhormonen.

In der Säugetierleber wird etwa 30% des aus Glucose stammenden CO_2 im Glucosemonophosphat-Shunt gebildet, während in der Nebennierenrinde, den Hoden und in der Milchdrüse der Anteil noch größer ist. Auch im Fettgewebe wird ein Teil der Glucose im Shunt oxydiert, dagegen scheint der Mechanismus in der quergestreiften Muskulatur nicht vorzukommen.

(Abb. 6)

Fettsäuren reagieren zunächst mit Coenzym A und ATP unter Bildung von Acyl-CoA, AMP und PP. Acyl-CoA wird dann durch die β-Oxydation in vier aufeinanderfolgenden Reaktionen zu Acetyl-CoA und ein um zwei C-Atome kürzeres Acyl-CoA abgebaut. Letzteres durchläuft die Schritte wiederholt, bis schließlich Acetoacetyl-CoA zu zwei Acetyl-CoA gespalten wird. Das System der Fettsäureoxydation ist in den Mitochondrien lokalisiert. Die punktierten Pfeile in Abbildung 6 zeigen in Richtung der Fett-

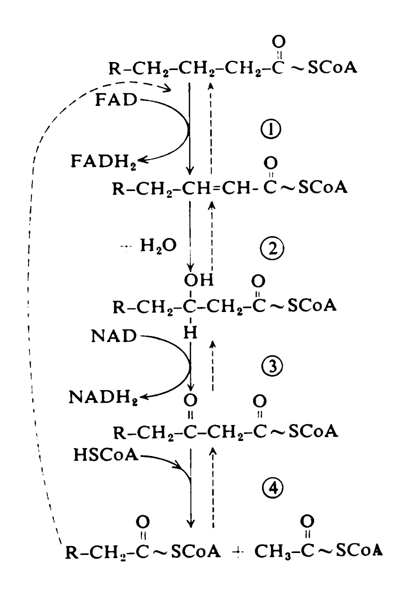


Abb. 6. Fettsäure-Oxydation.

Enzymreaktionen:

1. Acyl-CoA-dehydrogenase [1.3.2.2]
   Acyl-CoA + oxyd. Cytochrom c → 2.3-dehydroacyl-CoA + red. Cytochrom c
   (Ein Flavinenzym. Die Oxydation von $FADH_2$ durch Cytochrom c ist im Schema nicht dargestellt.)
2. Enoyl-CoA-hydratase [4.2.1.17]
   2.3-dehydroacyl-CoA + H_2O → 3-hydroxyacyl-CoA
3. 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [1.1.1.35]
   3-hydroxyacyl-CoA + NAD → 3-oxoacyl-CoA + $NADH_2$
4. 3-oxoacyl-CoA-thiolase [2.3.1.16]
   3-oxoacyl-CoA + CoA → Acyl-CoA + Acetyl-CoA

Die um 2 C ärmere Fettsäure durchläuft den Zyklus erneut (gestrichelter Pfeil), bis sie schließlich über Acetoacetyl-CoA zu zwei Acetyl-CoA gespalten wird.

säuresynthese. Diese Reaktionsfolge als einfache Umkehr des Abbaus spielt eine untergeordnete Rolle bei der Fettsäuresynthese und dient wahrscheinlich nur dazu, existierende kurzkettige Fettsäuren zu verlängern. Die *de-novo-Synthese* von Fettsäuren aus Acetyl-CoA findet vielmehr im Cytoplasma statt und wird durch das Fettsäuresynthese-System (Abb. 7) katalysiert. Beim einmaligen Durchlaufen der Reaktionssequenz wird die Fettsäure um 2 C-Atome verlängert.

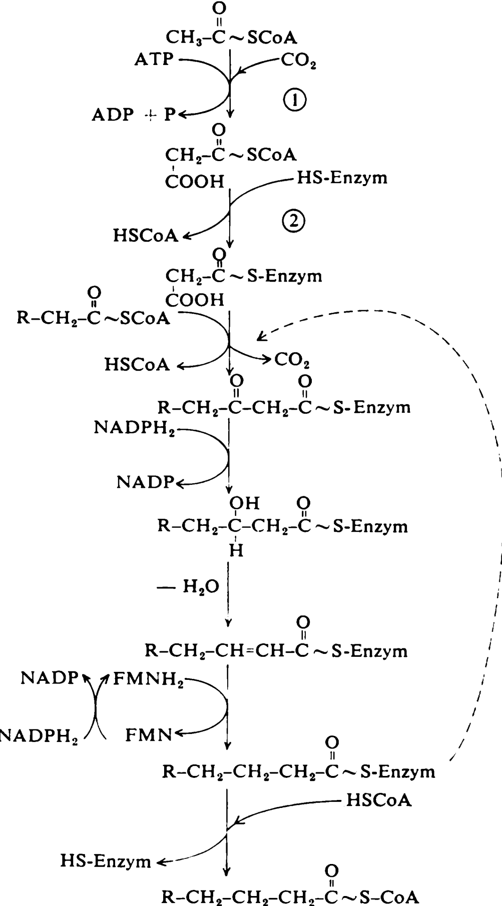


Abb. 7. Fettsäure-Synthese.
Enzymreaktionen:

1. Acetyl-CoA-carboxylase [6.4.1.2]
   ATP + Acetyl-CoA + $CO_2 \rightarrow$ ADP + P + Malonyl-CoA
2. Fettsäure-Synthetase
   Ein Multienzym-System (LYNEN).

CITRAT-ZYKLUS
(Abb. 8)

Im Citrat-Zyklus wird Acetyl-CoA zu CO_2 und H_2O oxydiert. Vom Pyruvat ausgehend, ergibt sich folgende Bilanz:

$$C_3H_4O_3 + 5\,O = 3\,CO_2 + 2\,H_2O$$

Sauerstoff reagiert nicht direkt mit den Substraten, sondern wird in Form von Wasser zugeführt (Reaktionen 2, 6 und 8). Die Oxydation der Substrate erfolgt dann durch Dehydrogenierung, wobei der Wasserstoff auf die entsprechenden Coenzyme übertragen und in der Oxydationskette (s. Abb. 12) mit Sauerstoff zu Wasser reagiert. Es werden 5 Wasserstoffpaare abgespalten (Reaktionen 1, 4, 5, 7 und 9). Entsprechend entstehen 5 H_2O (netto 2 H_2O gebildet). Die Wasserumlagerung in Reaktion 3 bleibt natürlich unberücksichtigt. Das H_2O in Reaktion 6 stammt aus der Synthese von GTP (Guanosintriphosphat).

STOFFWECHSEL DER AMINOSÄUREN

Mit wenigen Ausnahmen beginnt der Abbau der Aminosäuren im Stoffwechsel mit der Abtrennung der Aminogruppe, indem diese entweder durch Aminosäure-oxydasen oxydativ abgespalten (es entsteht freies NH_3) oder durch die Aminotransferasen auf eine 2-Oxosäure übertragen wird.

$$\text{Alanin} + \text{2-Oxoglutarat} \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{Glutamat}$$

Aus den Aminosäuren entstehen dabei 2-Oxosäuren, die auf verschiedenen Wegen, die hier nicht im einzelnen besprochen werden können, abgebaut werden. Aus einigen dieser Säuren entstehen Verbindungen der Glycolyse und des Citrat-Zyklus (s. Tab. 5). NH_3 dient zur Synthese neuer Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Porphyrine. Freies NH_3 ist toxisch und wird durch die Synthese von Harnstoff und Glutamin entgiftet. Glutamin ist unter anderem die Muttersubstanz für die Bildung und Ausscheidung von NH_3 in der Niere.

DIE REGULATION DES INTERMEDIÄREN STOFFWECHSELS

Kontrollmechanismen, die den intermediären Stoffwechsel steuern, sind komplexe Vorgänge, von denen erst wenige Einzelheiten bekannt sind. Im Endeffekt wird jede Kontrolle durch Beeinflussung der Enzymaktivitäten, hemmend oder beschleunigend, ausgeübt.

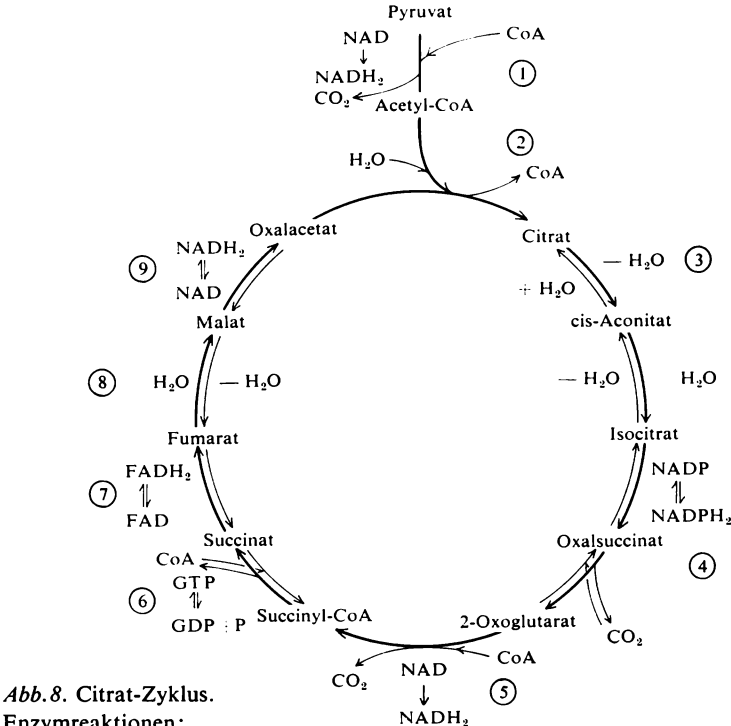


Abb. 8. Citrat-Zyklus.

Enzymreaktionen:

1. Pyruvat-dehydrogenase-System [1.2.4.1 und 2.3.1.12]
   Pyruvat + HSCoA + NAD → Acetyl-SCoA + $NADH_2$ + CO_2
   (weitere Coenzyme: Thiamin-pyrophosphat, Lipoat)
2. Citratsynthase [4.1.3.7]
   Acetyl-SCoA + Oxalacetat + H_2O → Citrat + HSCoA
3. Aconitathydratase [4.2.1.3]
   Citrat (—H_2O ⇌ cis-Aconitat + H_2O) ⇌ Isocitrat
4. Isocitrat-dehydrogenase [1.1.1.42]
   a. Isocitrat + NADP ⇌ Oxalsuccinat + $NADPH_2$
   b. Oxalsuccinat ⇌ 2-Oxoglutarat + CO_2
5. Oxoglutarat-dehydrogenase (α-Ketoglutarat-dehydrogenase) [1.2.4.2]
   2-Oxoglutarat + HSCoA + NAD → Succinyl-SCoA + $NADH_2$ + CO_2
   (weitere Coenzyme: Thiamin-pyrophosphat, Lipoat)
6. Succinyl-CoA-synthetase [6.2.1.4]
   Succinyl-SCoA + GDP + P ⇌ Succinat + GTP + HSCoA
7. Succinat-dehydrogenase [1.3.99.1]
   Succinat + FAD ⇌ Fumarat + $FADH_2$
8. Fumarat-hydratase [4.2.1.2]
   Fumarat + H_2O ⇌ Malat
9. Malat-dehydrogenase [1.1.1.37]
   Malat + NAD ⇌ Oxalacetat + $NADH_2$

Die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion ist unterhalb der Substratsättigung weitgehend, wenn auch nicht ausschließlich, von der Substratkonzentration abhängig. Der schnellste Umsatz wird beobachtet, wenn das Enzym mit Substrat gesättigt ist (s. Seite 15). Unter physiologischen Bedingungen wird dieser Zustand nicht erreicht, so daß die Substratkonzentration geschwindigkeitsbestimmend wird. Intermediär gebildete Substrate häufen sich normalerweise nicht an, sondern werden weiter umgesetzt, sobald sie gebildet sind. Diese Tatsache bedeutet mit anderen Worten, daß die Menge an Enzymen in den Geweben ausreicht, um eine Anhäufung von Intermediärprodukten zu vermeiden. Nun sind aber Erkrankungen bekannt, bei denen es zur Anhäufung von Metaboliten kommt. In vielen Fällen ist es gelungen, diese Störung auf das Fehlen eines einzigen Enzyms zurückzuführen (s. Erbliche Stoffwechselkrankheiten). Demnach muß unter die Kontrollmechanismen auch die von den Genen abhängige Synthese von Ezymproteinen gerechnet werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Konzentration der Coenzyme. Bei den Nicotinamid-adenin-dinucleotiden spielt ferner das Verhältnis der oxydierten zur reduzierten Form eine wichtige Rolle ($NAD/NADH_2$, $NADP/NADPH_2$). Für die Synthese von Fettsäuren und Steroidhormonen zum Beispiel wird $NADPH_2$ benötigt, das im Glucosemonophosphat-Shunt gebildet wird. Eine gesteigerte Fettsäuresynthese verbraucht mehr reduziertes Coenzym und aktiviert dadurch die Glucoseoxydation im Shunt.

Im Kapitel über die Enzymologie der Zelle wird die räumliche Organisation von Multi-Enzymsystemen besprochen. Man muß diese unter den Begriff der Kontrolle des intermediären Stoffwechsels mitrechnen. In den Mitochondrien können Substrate, Coenzyme und Cofaktoren weit über die Konzentration im Cytoplasma hinaus konzentriert werden, wodurch die Kinetik der in den Mitochondrien ablaufenden Enzymreaktionen weitgehend beeinflußt wird.

Regulierend wirkt auch das Verhältnis von ADP zu ATP und die Konzentration an anorganischem Phosphat. ATP wird bei der Glycolyse und bei der Oxydation des Wasserstoffs in der Elektronentransportkette (Zellatmung) gebildet. Die Glycolyse und die Atmung konkurrieren um das ADP und das anorganische Phosphat. Hiermit ist der Pasteur-Effekt, das heißt die Hemmung der Glycolyse durch die Zellatmung, erklärt worden. Verstärkte Zellatmung verbraucht mehr ADP und anorganisches Phosphat, wodurch die Glycolyse gehemmt wird. Nach einer Theorie von LYNEN wirkt das anorganische Phosphat über die Glyceraldehyd-phos-

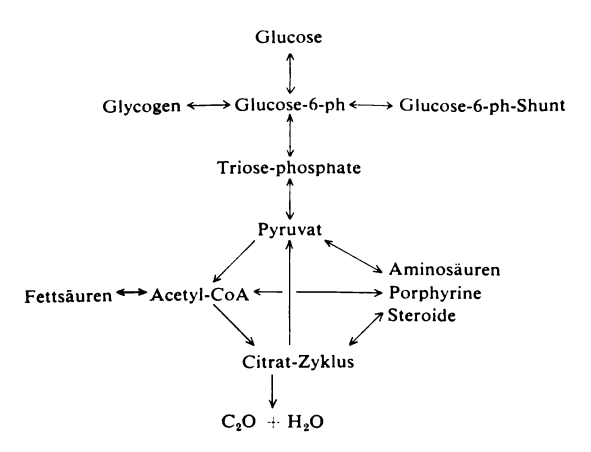


Abb. 9. Verzweigungsstellen des intermediären Stoffwechsels.

phat-dehydrogenase (Reaktion 6 in Abb. 2), und das ADP über die Phosphoglycerat-kinase (Reaktion 7 in Abb. 2) steuernd auf die Glycolyse. Andererseits wird aber auch die Zellatmung durch Herabsetzung der intrazellulären Konzentration des anorganischen Phosphats gehemmt, und zwar wesentlich stärker als die Glycolyse.

Einige im Stoffwechsel gebildete Produkte hemmen schon in sehr geringen Konzentrationen bestimmte Enzymreaktionen. Dieser Mechanismus wird als «feedback» bezeichnet. Als Beispiel sei hier die Hexokinase genannt, die schon von sehr geringen Konzentrationen von Glucose-6-phosphat, also ihrem eigenen Reaktionsprodukt, gehemmt wird. Es ist durchaus denkbar, daß diese Hemmung, und vielleicht noch weitere analoge Effekte an anderer Stelle der Glycolyse, die Umsatzrate von Glucose steuern.

Eine sehr interessante Frage ist, wie an Verzweigungsstellen des Stoffwechsels (Abb. 9) entschieden wird, welchen Weg ein Metabolit einschlägt. So kann Glucose-6-phosphat drei Wege gehen: Glycogensynthese, Glycolyse und Glucose-6-phosphat-Shunt. Am Beispiel der Coenzyme wurde oben demonstriert, daß gesteigerte Fettsäuresynthese durch Verbrauch von $NADPH_2$ den Shunt anregt.

Es ist weiter bekannt, daß ein Intermediärprodukt des Shunts, die 6-Phosphoglucuronsäure (Abb. 4), die Glucosephosphat-isomerase der Glycolyse inhibiert (Reaktion 2 in Abb. 2). Dadurch wird die Glycolyse eingeschränkt, und Glucose-6-phosphat steht in größerer Menge als Substrat für den Shunt zur Verfügung.

Schließlich muß man bei den höheren Lebewesen noch an die nervöse und hormonale Kontrolle des Stoffwechsels denken. Über den Einfluß des Zentralnervensystems auf den intermediären Stoffwechsel wissen wir noch recht wenig. Wahrscheinlich übt es seine regulatorische Funktion über die innersekretorischen Drüsen aus. Hormone und ihre Wirkung auf den Stoffwechsel sind im folgenden Abschnitt besprochen.

LITERATUR

Metabolic Pathways. Vol. I. Herausgeber: D. M. Greenberg, Academic Press, New York 1960.

B. Axelrod: Glycolysis. S. 97.

H. A. Krebs und J. M. Lowenstein: The tricarboxylic acid cycle. S. 129.

B. Axelrod: Other pathways of carbohydrate metabolism. S. 205.

D. E. Greenberg und D. M. Gibson: Fatty acid oxydation and synthesis. S. 301.

H. A. Krebs und H. L. Kornberg: Energy transformations in living matter. Erg. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharm. *49*, 212, 1957.

F. Lynen, in: Neuere Ergebnisse aus Chemie und Stoffwechsel der Kohlenhydrate. Verlag Lange & Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.

L. Kiesow: Über die Orthophosphorsäure bei der Pasteurschen Reaktion und beim Crabtree-Effekt. Z. Naturforschg. *16b*, 32, 1961.

Hormone greifen regulierend in den intermediären Stoffwechsel ein. Obwohl die Symptome und Krankheitsbilder bei mangelnder Bildung, Überproduktion oder gestörtem Zusammenspiel mit Antagonisten für die meisten Hormone bekannt sind, wissen wir noch recht wenig über den eigentlichen Wirkungsmechanismus und die Angriffspunkte der Hormone im Stoffwechsel. Gegenwärtig werden drei Theorien diskutiert:

1. Hormone regulieren direkt die Aktivität einzelner Enzyme oder ganzer Enzymsequenzen.
2. Hormone greifen an der Struktur der Zellmembran (einschließlich intrazellulärer Membranen) an und regulieren die Permeabilität.
3. Hormone regulieren die Proteinsynthese (und damit die Enzymsynthese) durch Aktivierung oder Hemmung bestimmter Gene.

Jede der drei Theorien ist experimentell gestützt, und eine Theorie schließt die anderen nicht aus. Im folgenden wird die Physiologie und Pathophysiologie einiger Hormone besprochen, deren Wirkungsmechanismus wir zu verstehen beginnen.

INSULIN

Das Hormon greift zunächst einmal an der Zellmembran an und fördert den Transport von Glucose, anderen Zuckern, Aminosäuren und Phosphat vom extrazellulären in den intrazellulären Raum. Es hat ferner, wenigstens im Muskel, Einfluß auf die Verteilung von Na^+ und K^+, die Aufnahme von K^+ in die Zelle wird beschleunigt, die Aufnahme von Na^+ gehemmt.

Insulin beeinflußt den Kohlehydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Die Synthese von Glycogen, Fettsäuren und Neutralfetten wird aktiviert, die Lipolyse wird gehemmt und die Proteinsynthese gefördert. In einigen Fällen wurde die Insulinwirkung auf den direkten Einfluß auf ein oder mehrere Enzyme zurückgeführt. Die Deutung der vielen experimentellen Befunde ist schwierig, da die Wirkung des Insulins in der Leber, im Muskel und im Fettgewebe verschieden zu sein scheint. Das hängt nicht zuletzt mit den Unterschieden im Glucosestoffwechsel in diesen Geweben zusammen.

Im Gegensatz zur Muskelzelle ist die Membran der Leberzelle frei durchgängig für Glucose. Die am Muskel beobachtete Förderung der Glucose-

aufnahme durch Insulin ist also für die Leber ohne Bedeutung. Nach der Aufnahme in eine Zelle wird Glucose zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Während die Leberzelle das entgegenwirkende Enzym, Glucose-6-phosphatase, enthält (Glucose-6-ph → Glucose + P), kommt dieses Enzym im Muskel nicht vor. Die Leberzelle ist daher relativ reich an freier Glucose, die Muskelzelle nicht.

Glucose-6-phosphat steht im Mittelpunkt des Glucosestoffwechsels und kann drei Stoffwechselwege einschlagen: 1. Glycolyse (Abb. 2); 2. Glucose-monophosphat-Shunt (Abb. 4); 3. Glycogenese (Abb. 22). Im Muskel wird unter der Wirkung des Insulins 60–90% der aufgenommenen Glucose in Glycogen umgewandelt, und es wurde nachgewiesen, daß Insulin das Enzym Glycogen-synthetase (Abb. 22, Reaktion 4) aktiviert. Daneben ist die Bildung von Lactat und CO_2 gesteigert. Im Fettgewebe wird unter Insulinwirkung vermehrt Glucose aufgenommen, Glycogen- und Lactatbildung sind gesteigert. Der größte Teil der aufgenommenen Glucose wird aber teils im Glucosemonophosphat-Shunt oxydiert, teils zur erhöhten Fettsäure- und Fettsynthese verwertet. Shunt und Fettsäuresynthese sind insofern miteinander gekoppelt, als ersterer NADP zu $NADPH_2$ reduziert, während bei der Fettsäuresynthese NADP regeneriert wird (Abb. 7).

Es ist noch nicht sicher entschieden, welcher der beiden Mechanismen von Insulin beeinflußt wird. Experimentelle Befunde sprechen dafür, daß die Fettsäuresynthese direkt aktiviert und der Shuntmechanismus durch die steigende Konzentration an NADP sekundär angeregt wird.

Der Glucosestoffwechsel in der Leber unterscheidet sich von dem im Muskel und im Fettgewebe besonders dadurch, daß Glucose nicht nur aus Glycogen, sondern auch aus den Metaboliten der Glycolyse und aus glycogenen Aminosäuren (via Phosphoenolpyruvat) gebildet werden kann. Mit anderen Worten: die Glycolyse ist in der Leber vollkommen umkehrbar. Dabei wird allerdings die Rückreaktion in einigen Schritten von anderen Enzymen als die Hinreaktion katalysiert (Abb. 2). In der Leberzelle kommen Enzyme vor, die im Muskel und im Fettgewebe nicht nachweisbar sind: Glucose-6-phosphatase, Fructose-1.6-diphosphatase und Phosphoenolpyruvat-carboxylase. Die Verlaufsrichtung der Glycolyse wird bestimmt durch die relativen Aktivitäten der jeweils entgegengesetzt wirkenden Enzympaare Hexokinase-Glucose-6-phosphatase und Phosphofructokinase-Fructose-1.6-diphosphatase. Beim Überwiegen der Kinasen wird die Glycolyse in Richtung Pyruvat, bei Überwiegen der Phosphatasen in Richtung Glucose verlaufen.

Über den Insulineffekt in der Leber sind die Untersuchungsergebnisse noch recht widersprechend. Insulin scheint die Hexokinase zu aktivieren und die Glycogensynthese und Lipogenese zu stimulieren. Ob dabei der Angriffspunkt an den gleichen Enzymen wie in Muskel und Fettgewebe erfolgt, ist noch nicht bekannt.

Sehr mangelhaft sind auch noch die Kenntnisse über den Einfluß des Insulins auf die Proteinsynthese. Insulin fördert die Inkorporation von Aminosäuren in Proteine sowohl in der Leber als auch im Muskel. Neben der Aktivierung des Transports durch die Zellmembranen sind aber noch keine anderen Angriffspunkte des Insulins im Proteinstoffwechsel bekannt geworden.

Beim *Diabetes mellitus* ist die Aufnahme von Glucose im Muskel und im Fettgewebe durch Fortfall der Aktivierung des Membrantransports gestört. Im Muskel sind außerdem die Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion gehemmt, wahrscheinlich durch die vermehrte Oxydation von Fettsäuren. Im Fettgewebe ist die Synthese von Fettsäuren gestört, und es wird im Gegenteil vermehrt Fett abgebaut. Die Fettsäuren werden ans Blut abgegeben. Als Folge der geringen Fettsäuresynthese ist die Glucoseoxydation im Shunt herabgesetzt.

In der Leber ist die Aktivität der Glucose-6-phosphatase und Fructose-1.6-diphosphatase gesteigert und die Aktivität der Hexokinase und Phosphofructo-kinase gemindert. Wie oben bereits erwähnt, wird beim Überwiegen der Phosphatasen der Verlauf der Glycolyse in Richtung Pyruvat gehemmt, in Richtung Glucose gefördert. Als Folge hiervon wird auch in gesteigertem Maße Glucose aus Aminosäuren gebildet. Beim Diabetes ist nicht nur die Aufnahme von Glucose in die Leberzellen vermindert, es wird auch mehr Glucose ans Blut abgegeben.

Die aus dem Fettgewebe abgegebenen Fettsäuren werden in der Leber durch die β-Oxydation zu Acetyl-CoA abgebaut, das dann in den Citrat-Zyklus einmündet. Beim Diabetes ist die Kapazität des Zyklus überschritten, und es werden aus Acetyl-CoA Acetessigsäure, β-Oxybuttersäure und Aceton gebildet.

EPINEPHRIN UND GLUCAGON

Beide Hormone haben im Kohlehydratstoffwechsel den gleichen Effekt, sie stimulieren den Abbau von Glycogen, und zwar durch Aktivierung der Phosphorylase (α-Glucan-phosphorylase, Abb. 22, Reaktion 6). Die Phosphorylase kommt in einer inaktiven Form vor, Phosphorylase b, die durch

Phosphorylierung in die aktive Form, Phosphorylase a, übergeht. Neben ATP als Phosphatdonor wird als Cofaktor zyklisches AMP zur Aktivierung benötigt. Die Bildung von zyklischem AMP wird durch das Enzym Adenylcyclase katalysiert, und auf diese Enzymreaktion wirken Epinephrin und Glucagon stimulierend (Abb. 10).

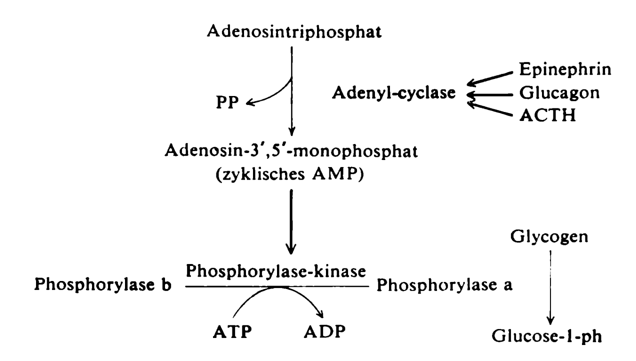


Abb. 10. Aktivierung der Phosphorylase (α-Glucan-Phosphorylase) durch Epinephrin, Glucagon und ACTH.

Die Adenyl-cyclase wird auch durch ACTH angeregt. Nach einer Theorie von HAYNES und BERTHET soll hierdurch der Einfluß des ACTH auf die Synthese der Steroidhormone in der Nebennierenrinde erklärt werden können. Zyklisches AMP aktiviert die Phosphorylase in der Nebennierenrinde. Beim Glycogenabbau entstehendes Glucose-6-phosphat wird im Glucose-6-phosphat-Shunt oxydiert. Hierbei wird $NADPH_2$ gebildet, das Coenzym für die Hydroxylierungsreaktionen bei der Steroidhormonsynthese. Siehe hierzu das Kapitel über das adrenogenitale Syndrom.

THYROXIN

In vitro entkoppelt Thyroxin die oxydative Phosphorylierung (s. Seite 54) und vermindert damit die Energieausbeute des Stoffwechsels. Die geringere Energieausbeute wiederum steigert die Aktivität der Atmungskette, und der Sauerstoffverbrauch steigt. Vielleicht ist der den Grundumsatz steigernde Effekt des Thyroxins im Organismus auf diesem Weg zu erklären. Thyroxin beeinflußt aber auch die Permeabilität der Mitochondrienmembran und könnte auf diese Weise regulierend in den Stoffwechsel eingreifen.

LITERATUR

The Hormones, Vol. IV und V. Herausgeber: G. PINCUS, K. V. THIMANN und E. B. ASTWOOD. Academic Press, New York 1964.

Vol. IV:

N. WEINER: The Catecholamines: Biosynthesis, storage and release, metabolism and metabolic effects. S. 403.

P. J. RANDLE: Insulin. S. 481.

P. P. FOÁ: Glucagon. S. 531.

Vol. V:

O. HECHTER, I. D. K. HALKERSTON: On the action of mammalian hormones. S. 697.

P. KARLSON: Biochemische Wirkungsweise der Hormone. Dtsch. med. Wschr. *86*, 668, 1961.

ENZYMOLOGIE DER ZELLE

Enzyme katalysieren den Stoffwechsel und sind damit integrierende Bestandteile der Lebensvorgänge. Der Stoffwechsel vollzieht sich intrazellulär, und der intrazelluläre Raum muß als der Wirkungsort der Enzyme angesehen werden. Eine Reihe von Enzymen werden aber auch extrazellulär gefunden – im Blutserum, im Liquor cerebrospinalis, in Exsudaten und im Urin –, doch sind nur wenige Enzymreaktionen bekannt, deren Wirkungsort extrazellulär ist (Beispiele: Hyaluronidase, Blutgerinnung, Lipasen). Es sei ausdrücklich betont, daß die Enzyme des Magendarmkanals von diesen Überlegungen ausgeschlossen sind.

Alle Zellen, so speziell ihre Funktionen in verschiedenen Organen auch sein mögen, haben gemeinsame morphologische und funktionelle Merkmale. Sie bestehen aus Cytoplasma mit einer Reihe von Organellen und sind von einer Membran umgeben. An Zellorganellen sind bisher bekannt: Nucleus, Mitochondrien, Ergastoplasma (Mikrosomen), Lysosome und Golgi-Apparat. Zu den grundlegenden Funktionen gehören die Transformation der von außen zugeführten Energie (Nahrungsstoffe und bei Pflanzen Strahlungsenergie) in für die Zelle nutzbare Energie, Synthese von zelleigenen Substanzen, Zellteilung und Vermehrung. Alle diese Vorgänge sind an die Aktivität von Enzymen gebunden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß der größte Teil der Zellproteine Enzyme sind.

Im Bericht der Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie von 1961 sind etwa 700 verschiedene Enzyme, die bisher in tierischen und pflanzlichen Geweben gefunden wurden, aufgeführt. Wenn auch keineswegs eine jede Zelle alle diese Enzyme enthält, sondern abhängig von ihrer speziellen Funktion über die notwendigen spezifischen Enzyme verfügt, so kann man in den meisten Fällen das Vorkommen einiger hundert verschiedener Enzyme annehmen.

Unwillkürlich drängt sich die Frage auf, wie in einer Zelle die mannigfaltigen, von Enzymen katalysierten Stoffwechselvorgänge integriert sind. Eine ältere Einteilung klassifiziert die Enzyme nach ihrer Extrahierbarkeit aus Geweben. Lysoenzyme gehen zum Beispiel beim Homogenisieren eines Gewebes leicht in Lösung, während Desmoenzyme an Zellpartikel gebunden sind und erst nach weitgehender Autolyse (vorwiegend proteolytische Zersetzung der Zellbestandteile) oder durch chemische Eingriffe (z.B. Extraktion mit n-Butanol) in Lösung gebracht werden können. Mit

modernen Fraktionierungsverfahren ist es möglich, die Zellorganellen vom Cytoplasma und voneinander zu trennen, in reinem Zustand zu erhalten und auf ihren Gehalt an Enzymen zu untersuchen. Nehmen wir als Beispiel den Abbau von Glucose zu CO_2 und H_2O. Die Enzyme der Glycolyse (Glucose → Pyruvat oder Laktat) finden sich im Cytoplasma, und der weitere Abbau durch die Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus und der Atmungskette erfolgt in den Mitochondrien. Während die Glycolysenenzyme anscheinend im Cytoplasma gelöst vorliegen (oder wenigstens beim Aufarbeiten des Gewebes leicht und im funktionstüchtigen Zustand in Lösung gehen), sind die Enzyme in Mitochondrien weitgehend strukturgebunden. Einige Autoren (z. B. MYRBÄCK, GREEN) nehmen an, daß auch die Enzyme im Cytoplasma «organisiert» sind (z. B. am Ergastoplasma [Mikrosomen]), um einen raschen und geordneten Ablauf der Reaktionssequenzen zu gewährleisten. Es ist aber durchaus denkbar, daß die Enzyme einer Reaktionskette wie der Glycolyse, an der 11 Enzyme beteiligt sind, in homogener Mischung vorliegen, denn die Spezifität der Enzyme garantiert ja, daß jedes Enzym nur mit dem Substrat aus der vorangegangenen Reaktion reagiert. DIXON und WEBB sprechen von einer «Organisation durch Spezifität».

Welches können aber die Gründe dafür sein, daß Enzyme strukturgebunden sind? Kehren wir zurück zu Abbildung 1. Wir haben gesehen, daß bei Enzym-Substratsättigung nur die spezifische Turnover-Zahl des Enzyms (definiert als Mol Substrat umgesetzt pro Mol Enzym pro Zeiteinheit) für die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmend ist. Die tatsächlich gemessene Reaktionsgeschwindigkeit hängt in einem solchen Versuchsansatz natürlich von der Menge des vorhandenen Enzyms ab. Gehen wir nun einen Schritt weiter zu einer Reaktionskette, wo bei der Umwandlung einer Substanz A in D drei verschiedene Enzyme beteiligt sind:

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D$$

so kommt als weiterer geschwindigkeitsbestimmender Faktor die Zeit dazu, die das in der vorhergegangenen Reaktion entstandene Substrat benötigt, um auf das Enzym zu treffen, das die folgende Reaktion katalysiert. Diese «Transit-Zeit» (DIXON und WEBB) wird um so länger sein, je geringer die Enzymkonzentration ist. Maximale Geschwindigkeit wird nur dann erreicht, wenn die Enzymmoleküle so dicht beieinander liegen, daß ein eben entstandenes Substrat sofort auf das nächste Enzymmolekül trifft. Ein solcher Zustand wird einfacher und mit geringeren Enzymkon-

zentrationen erreicht, wenn die an der Reaktionskette beteiligten Enzyme in der Reihenfolge, in der sie wirken, an einer Struktur haften. Am Cytochromsystem (Elektronentransportsystem), welches an die Mitochondrienstruktur gebunden ist, wurde gezeigt, daß Cytochrom c *innerhalb* solcher Partikel einen wesentlich größeren katalytischen Effekt hat als Cytochrom c, das dem Versuchsansatz in gleicher Konzentration in Lösung zugesetzt wurde. Auf die oben gestellte Frage nach dem Grund für die Strukturbindung der Enzyme, läßt sich folgende Antwort geben: Durch strukturelle Organisation der Enzyme kommt die Zelle wahrscheinlich mit wesentlich geringeren Enzymmengen aus, da die Transitzeiten für die Substrate kürzer werden.

Während diese Antwort von der Zweckmäßigkeit ausgeht, wird für andere Reaktionsketten die Strukturbildung zur Notwendigkeit, wie zum Beispiel bei der Proteinsynthese.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, daß eine Reihe von Hydrolasen, unter ihnen Cathepsin und Ribonucleasen, in den Lysosomen lokalisiert sind. Da die Lysosomenmembran für die Enzyme und Substrate undurchlässig ist, können die Enzyme ihre Wirkung nur nach Ruptur, sei es unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen, entfalten. Da Cathepsine und Ribonucleasen lebenswichtige Substanzen der Zelle abzubauen vermögen (Proteine und Nucleinsäuren), kann der Einschluß in die Lysosome eine Art Schutzmechanismus bedeuten.

DIE ZELLORGANELLEN

Zellkern

Der Zellkern ist der Sitz des genetischen Apparates, der Chromosomen, die aus Desoxyribonucleinsäure aufgebaut sind und die Gene enthalten. Die Gene sind ein essentieller Teil des Proteinsynthesemechanismus und damit der Enzymsynthese (Einzelheiten s. unter Proteinsynthese). Eine weitere wichtige Funktion des Kerns ist die Synthese von Pyridinnucleotid-Coenzymen.

In den Nucleoli wurde ein Enzym gefunden, das die Reaktion

$$\text{Nicotinamid-mononucleotid} + \text{ATP} \rightarrow \text{Nicotinamid-adenin-dinucleotid} + \text{PP}$$

katalysiert. Im Zellkern wurden Enzyme und Substrate der Glycolyse gefunden, und vieles spricht dafür, daß der Zellkern die für seine Funktionen notwendige Energie durch die Glycolyse (Bildung von ATP) erhält. Mit

höherer Aktivität als im Cytoplasma werden im Kern Enzyme des Nucleosidstoffwechsels gefunden, zum Beispiel Nucleosid-phosphorylase,

$$\text{Base} + \text{Ribose-phosphat} \rightarrow \text{Nucleosid} + \text{Phosphat}$$

und es sieht so aus, als ob im Kern die Bausteine für die Nucleinsäuren synthetisiert würden.

Ergastoplasma und Mikrosome (Ribosome, Biosome)

Das Cytoplasma anscheinend aller Zellen, mit sicherer Ausnahme jenes der Erythrozyten, ist von einem Netzwerk, das aus einer lipoidhaltigen Doppelmembran mit darin eingebetteten Granula besteht, durchzogen. Dieses Netzwerk bildet mit dem Cytoplasma eine Durchdringungsstruktur und wird als Ergastoplasma oder endoplasmatisches Retikulum bezeichnet. Beim Aufschließen der Zellen, zum Beispiel beim Homogenisieren, wird die Struktur des Ergastoplasmas zerstört, und es entstehen Fragmente, die als Mikrosome (Synonyme: Ribosome, Biosome) bezeichnet werden. Die Mikrosome können vom Cytoplasma und den anderen Zellorganellen getrennt gewonnen werden. Mikrosome sind, mit anderen Worten, Artefakte oder, weniger kraß ausgedrückt, Bestandteile des Ergastoplasmas, aus deren chemischer und biochemischer Analyse Rückschlüsse auf das Ergastoplasma gemacht werden. Die erwähnten Granula sind reich an Ribonucleinsäuren (RNS). Interessant ist, daß die Lipoiddoppelmembran des intakten Ergastoplasmas in Kontinuität mit der Membran des Nucleus und mit der Zellmembran steht (Abb. 11). Funktionell ist das Ergastoplasma die Stätte der Proteinsynthese in der Zelle (für Einzelheiten s. Proteinsynthese).

Über die Lokalisation weiterer Enzyme oder Enzymsysteme im Ergastoplasma (Mikrosomen) ist wenig Sicheres bekannt. Da das Ergastoplasma bei der Zellaufarbeitung zerstört wird und nur die Mikrosomen als strukturelle Fraktionen erhalten bleiben, ist es auch schwierig, zu schlüssigen Ergebnissen zu gelangen. Es ist durchaus denkbar, daß eine ganze Reihe von Cytoplasmaenzymen an die Ergastoplasmastruktur in der intakten Zelle gebunden sind und bei der Aufarbeitung in Lösung gehen. Folgende Enzyme wurden in der isolierten Mikrosomenfraktion nachgewiesen: Acetylcholinesterase, Cholinesterase, Vitamin-A-esterase, Cholesterol-esterase, alkalische Phosphatase, Glucose-6-phosphatase und Hydroxylasen.

Während die Proteinsynthese in den RNS-haltigen Anteilen des Ergastoplasmas vor sich geht (Mikrosome), ist der Membrananteil an der Synthese von Steroiden beteiligt.

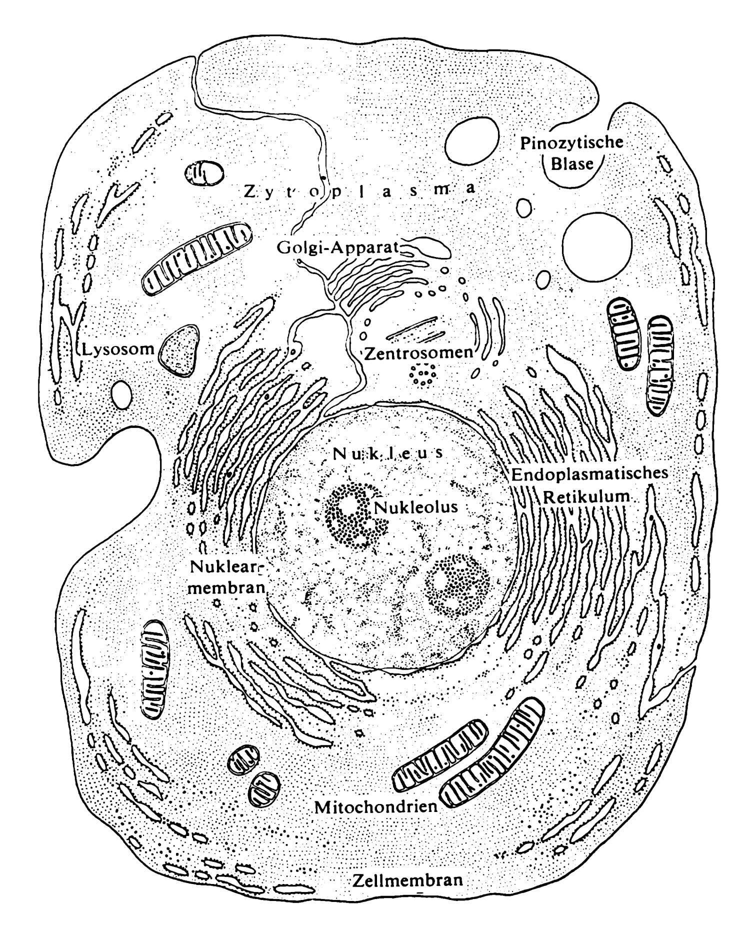


Abb. 11. Modernes Diagramm einer typischen Zelle (nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen).
Die Punkte entlang dem endoplasmatischen Retikulum sind Ribosome. In den Ribosomen findet die Proteinsynthese statt. (Aus Scientific American *205*, 55 [1961], mit Genehmigung des Verlages.)

Mitochondrien

Die Mitochondrien sind als die «Kraftstation» der Zelle bezeichnet worden, denn hier vollzieht sich die Umwandlung der durch Oxydation von Substraten freigesetzten Energie in für die Zelle nutzbare Energie. Durch den Vorgang der oxydativen Phosphorylierung werden energiereiche Phosphatbindungen in Form von ATP synthetisiert. Mitochondrien werden in allen aeroben Organismen gefunden und enthalten das Enzymsystem für

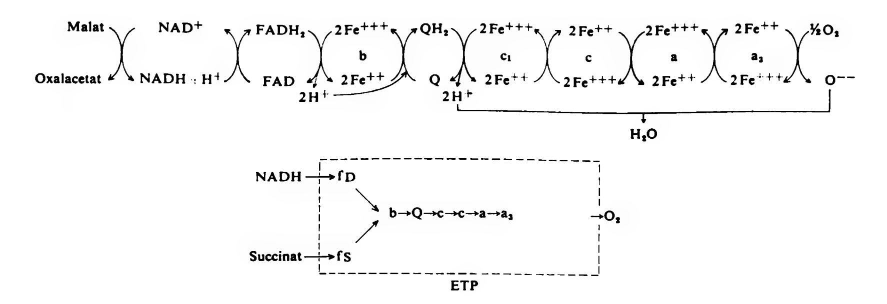


Abb. 12. Endoxydation des Wasserstoffs in der Elektronentransportkette. Erklärungen siehe Text.

den Citrat-Zyklus (Abb. 8), die Enzyme für den Elektronentransport (Abb. 12) und die mit letzterem gekoppelte oxydative Phosphorylierung. Ferner sind in den Mitochondrien die Enzyme für die β-Oxydation der Fettsäuren (Abb. 6) enthalten, die zu Acetyl-CoA führt, das dann im Citrat-Zyklus weiter oxydiert wird. Daneben kommen noch, je nach spezieller Funktion der Zellen, in verschiedenen Organen andere Enzyme vor. Mitochondrien enthalten den kompletten Satz aller für die genannten Reaktionen notwendigen Enzyme, Coenzyme und Cofaktoren. Von außen werden nur zugeführt: entsprechende Substrate, anorganisches Phosphat, ADP und Sauerstoff. Die Struktur der Mitochondrien ist charakteristisch. In den letzten Jahren ist es GREEN und seinen Mitarbeitern gelungen, Mitochondrien in eine Reihe kleiner Partikel unterschiedlicher Funktionstüchtigkeit zu zerlegen. Die sogenannten Elektronentransportpartikel (ETP) besitzen zwar die komplette Elektronentransportkette und können die Oxydation von Succinat und NADH durch molekularen Sauerstoff katalysieren (s. Abb. 12), enthalten aber keine Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus und können nicht oxydativ phosphorylieren. Eine andere Partikelart, von GREEN als ETPH bezeichnet, koppelt Oxydation von Succinat oder NADH mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP.

Die Pyridinnucleotid-Coenzyme und die entsprechenden Enzymproteine sind in intakten Mitochondrien an die Struktur gebunden. Zugesetztes NADH wird nicht oxydiert. Werden Mitochondrien in die genannten Fraktionen zerlegt, so gehen neben den Enzymen des Citrat-Zyklus auch die Pyridinnucleotidenzyme und die Pyridinnucleotide verloren. (Jetzt aber kann den Partikeln zugesetztes NADH oxydiert werden.)

Die Elektronentransportkette besteht aus 2 Flavinenzymen (NADH-dehydrogenase und Succinat-dehydrogenase), den Cytochromen a, b, c

und c_1 sowie dem Coenzym Q, das nach GREEN zwischen Cytochrom b auf der Elektronendonorseite und Cytochrom a auf der Elektronenakzeptorseite eingeschaltet sein muß. Ob Coenzym Q Elektronen von reduziertem Cytochrom b aufnehmen kann oder direkt mit den Flavinenzymen reagiert und Cytochrom b dazu dient, Elektronen von den Fettsäuredehydrogenasen aufzunehmen, ist noch nicht entschieden. Die beiden Reaktionsketten sind in Abbildung 12 dargestellt. Ein wesentlicher Bestandteil der Mitochondrienstruktur sind Lipoproteine, an denen Mitochondrien und die ETP reich sind. Nach GREENS Hypothese sind die Flavinenzyme und die Cytochrome b, c_1 und a fest an die Struktur gebunden, während Cytochrom c, Coenzym Q und vielleicht noch andere im Mitochondrium gefundene Verbindungen, wie α-Tocopherol (Vitamin E), im Lipoprotein als bewegliche Elektronenüberträger funktionieren.

Sehr wenig ist über den Mechanismus der Kopplung von Elektronentransport (Oxydation) und Phosphorylierung, $ADP + P_i \rightarrow ATP$, bekannt. Möglicherweise spielen Coenzym Q und Cytochrom c im Lipoidanteil der Mitochondrienstruktur bei diesem Vorgang die entscheidende Rolle und werden noch hypothetische, sehr labile phosphorylierte Zwischenverbindungen im Lipoid gebildet, wo sie im nicht wässrigen Medium stabil sind.

Lysosome

Lysosome sind relativ schwer von der Mitochondrienfraktion zu trennen und werden bei der Aufarbeitung des Gewebes leicht zerstört, wodurch die Enzyme austreten und fälschlicherweise als Cytoplasma-Enzyme angesehen werden können. Der Entdecker der Lysosome, DE DUVE, ist sich dieser Schwierigkeit voll bewußt und ist in der Interpretation seiner Versuchsergebnisse sehr vorsichtig. Aber als Arbeitshypothese haben sich die folgenden Vorstellungen bisher gut bewährt. In den Lysosomen wurden bisher folgende Enzyme aufgefunden: saure Phosphatase, saure Ribonuclease und Desoxyribonuclease, Cathepsin, Aryl-sulfatase, Phosphoproteinphosphatase und β-N-Acetyl-glucuronidase. Abbildung 13 zeigt schematisch die Lysosome und die Substrate, die nach Auflösung der Membran angegriffen werden – und es ist ohne weiteres ersichtlich, daß lebenswichtige Substanzen wie Proteine und Nucleinsäuren von den freien Enzymen abgebaut werden können. Lysosome wurden zuerst in der Leber gefunden und studiert, lassen sich aber auch in anderen Organen, wie Niere, Gehirn und Thymusdrüse, nachweisen, und es ist wahrscheinlich, aber noch nicht bewiesen, daß sie in allen tierischen Geweben vorkommen. Man nimmt an, daß die Lysosomenenzyme in physiologischen und pathologischen

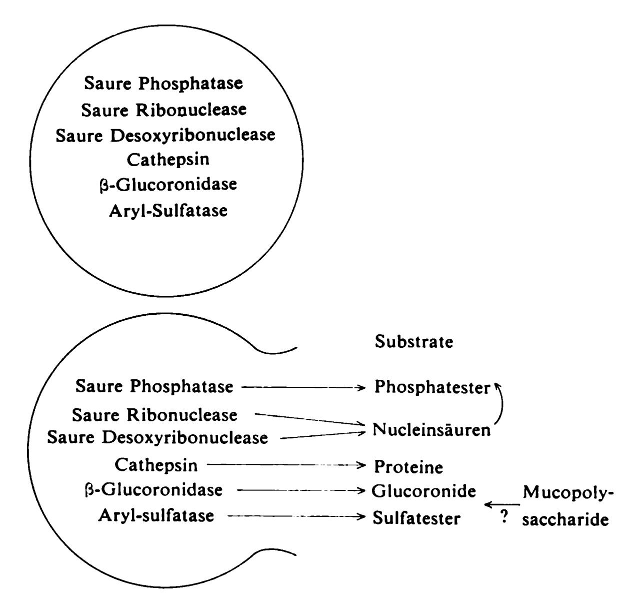


Abb. 13. Lysosome.
Erklärungen siehe Text.

Autolysevorgängen eine Rolle spielen. Als physiologische Vorgänge sind die Involution der Thymusdrüse zur Pubertät und des Uterus im Klimakterium zu nennen. Es ist weiter denkbar, daß diese Enzyme am normalen Turnover von Proteinen und Nucleinsäuren teilnehmen. DE DUVE konnte im Experiment zeigen, daß Anoxie zur Freisetzung der Lysosomenenzyme führt und nekrotische Phänomene in strenger Korrelation zur Menge der freigesetzten Enzyme stehen. Als weitere Faktoren, die zur Ruptur der Lysosomenmembran führen, sind zu nennen: Gallensäuren, CCl_4 und Azidose, hervorgerufen durch Anoxie oder Ketosis.

Die Zellmembran

Zellmembranen sind aufgebaut aus Proteinen und Lipoiden, und zwar derart, daß eine Lipoidschicht je von einer Proteinschicht außen und innen eingeschlossen ist. Die Zellmembran darf keineswegs als eine passive Struktur aufgefaßt werden, die den Zellinhalt vor dem Auseinanderfließen bewahrt und durch die ein freier Stoffaustausch mit der Umgebung stattfindet. Die Zellmembran hat im Gegenteil sehr wesentliche Funktionen zu erfüllen – die der Auslese der Stoffe, die in die Zelle gelangen und die aus der Zelle austreten. Für die meisten Substanzen wird ein aktiver Transport durch

die Zellmembran angenommen, während passive Diffusion nur eine untergeordnete Rolle spielt. Der aktive Transport ist in seinen Einzelheiten noch nicht aufgeklärt. Sicher ist, daß Enzyme in der Zellmembran vorkommen, die den aktiven Transport katalysieren. Eine entscheidende Rolle soll einer durch Kalium- und Natriumionen aktivierten ATP-ase zufallen, und ATP wird als der direkte Energielieferant für den aktiven Transport angesehen. Es sieht so aus, als ob in der Zellmembran lipoidlösliche spezifische Carrier vorkommen, an welche die zu transportierenden Moleküle gebunden und durch die Membran hindurchgeschleust werden. Für den Transport von K und Na wird eine Phosphatidsäure als Carrier diskutiert. Da Näheres über die Enzyme beim aktiven Transport noch nicht bekannt ist, spricht man von einem «Permease-System». Interessant ist, daß die erwähnte Na-K-aktivierte ATP-ase durch Herzglycoside gehemmt wird.

Bei der Betrachtung der Funktion der Zellmembran darf nicht übersehen werden, daß die Zelle nicht nur nach außen hin von einer Membran begrenzt wird, sondern daß das Ergastoplasma eine membranartige Struktur enthält. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, wird eine Kontinuität der Membran angenommen, wodurch eine enorme Vergrößerung der Zelloberfläche entsteht. Möglicherweise werden die Membranen in der Zelle vom Golgi-Apparat gebildet.

LITERATUR

J. Brachet: Biochemical Cytology. Academic Press, New York 1957.

D. E. Green und S. Fleischer: Metabolic Pathways Vol. I. Editor D. M. Greenberg. Academic Press, New York 1960.

M. Dixon und E. C. Webb: Enzymes. Academic Press, New York 1958.

Subcellular Particles. T. Hayashi, Editor. The Ronald Press Company, New York 1959.

The Cell Nucleus. J. S. Mitchell, Editor. Academic Press, New York 1960.

A. L. Lehninger: The Mitochondrion. W. A. Benjamin, Inc., Amsterdam 1964.

ENZYMOLOGIE DER ORGANE

Die Stoffwechselleistungen eines Organs können auf verschiedene Weise bestimmt werden: 1. *Durchströmungsversuche* in situ oder an isolierten Organen, wobei die arterio-venöse Differenz von Substraten und Stoffwechselprodukten gemessen wird. Bei der Niere und der Leber können außerdem Bestimmungen im Urin beziehungsweise in der Galle vorgenommen werden. 2. Stoffwechselversuche mit *Organschnitten*. Sehr dünne, frische Organschnitte werden in Nährlösungen, die das zu untersuchende Substrat enthalten, inkubiert. Die große Gewebsoberfläche erlaubt einen raschen Austausch von Substrat und Stoffwechselprodukten, die im Inkubationsmedium oder im Gewebe nach mechanischem Aufschluß der Zellen bestimmt werden können. Als wichtigste dieser Methoden sind die von O. WARBURG entwickelten manometrischen Verfahren zu nennen. 3. *Untersuchung einzelner Enzymreaktionen* oder Reaktionssequenzen in frischen oder gefriergetrockneten Gewebeschnitten, Homogenaten, Extrakten, isolierten anatomisch und funktionell einheitlichen Zellgruppen, in fraktionierten Zellorganellen und schließlich in gereinigten Enzympräparationen.

Diese und andere Untersuchungsmethoden sind durch Anwendung radioaktiver Isotope entscheidend verfeinert worden.

Dieses Kapitel wird im wesentlichen die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Leber und Niere und ihre Bedeutung für die Medizin behandeln.

METHODEN

Enzymaktivitätsbestimmungen in Homogenaten, Extrakten und getrockneten Gewebe- und Zellpräparaten sind technisch nicht schwieriger als Aktivitätsbestimmungen in Körperflüssigkeiten. Jedoch müssen einige Punkte besonders beachtet werden. Bei der Gewebeaufarbeitung werden Artefakte erzeugt, und je nach Technik erhält man höhere oder niedrigere Enzymaktivitäten (s. Tab. 6). Danach wird in gefriergetrockneten Gewebe*schnitten* etwa fünfmal so hohe Aktivität für LDH und alkalische Phosphatase gefunden als im Homogenat. Auch die Art des Homogenisierens ist von Einfluß. Einige Enzyme verlieren ihre Aktivität, wenn ein Apparat vom Typ des «Star-Mix» verwendet wird, behalten ihre Aktivität aber beim Homogenisieren im Potter-Elvejhem-Glashomogenisator. In vergleichenden Untersuchungen müssen die Aufarbeitungsbedingungen also

Tabelle 6. Der Effekt verschiedener Gewebeaufbereitungen auf die Aktivität von Gewebeenzymen

Aufbereitung	Alkalische Phosphatase Leber	Niere	Lactat-dehydrogenase Leber	Niere
Gefriergetrockneter Gewebeschnitt (16 μ)	100	100	100	100
Gefriergetrocknetes Homogenat	35	33	44	37
Homogenat (feucht)	17	29	29	32
nach 1 Tag bei — 35 °C	17	29	29	32
nach 7 Tagen bei — 35 °C	18	29	27	30
nach 7 Tagen bei + 4 °C	28	45	24	26

Die Aktivität im gefriergetrockneten Schnitt wurde gleich 100% gesetzt. (Nach S. L. Bonting und I. M. Rosenthal: Nature *185*, 686, 1960.)

genau standardisiert werden. Bei der Enzymbestimmung in Autopsiegewebe muß man prüfen, ob das zu bestimmende Enzym durch Autolyse der Organe zerstört wird. Nach Erfahrung des Autors sind Dehydrogenasen und Aminotransferasen sowie Phosphatasen relativ stabil und noch 6–12 Stunden nach eingetretenem Tod voll aktiv. Andere Enzyme, wie die Glutaminasen, sind schon 2 Stunden nach dem Tode kaum noch nachweisbar, was in der älteren Literatur zur Behauptung geführt hat, daß Glutaminasen in der menschlichen Niere nicht vorkommen.

Will man die unter optimalen Versuchsbedingungen bestimmten Enzymaktivitäten mit physiologischen Stoffwechselvorgängen in einem Organ in quantitative Beziehung setzen, so ergeben sich weitere Schwierigkeiten. Die in vitro optimalen Bedingungen für Enzymreaktionen weichen mehr oder weniger stark vom intrazellulären Milieu ab. Zwar können in Gewebe und Zellhomogenaten Substrate, Coenzyme, Inhibitoren und Aktivatoren recht genau quantitativ bestimmt werden, doch erhält man damit nur Durchschnittswerte. Der Zellraum ist weitgehend unterteilt (s. Abschnitt Zelle), und man muß annehmen, daß gelöste Stoffe nicht homogen verteilt sind, sondern lokal in dem einen oder anderen Kompartiment angereichert sind. Somit können am Ort der Enzymreaktion durchaus andere Konzentrationsverhältnisse herrschen, als im Homogenat bestimmt wurde. Ähnliche Überlegungen gelten für die Wasserstoffionenkonzentration. Intrazelluläre pH-Bestimmungen sind mit Nadelglaselektroden und mit Farbindikatoren durchgeführt worden, aber die Ergebnisse sind höchst unsicher.

Ein modernes Hilfsmittel der klinischen Diagnostik ist die Nadelbiopsie. Die gewonnenen Gewebeproben aus Leber oder Niere wiegen zwischen 10 und 40 mg. Nachdem etwa 1/3 des Gewebezylinders für histologische Untersuchung abgenommen wurde, verbleibt genug, um mit Mikromethoden Enzymbestimmungen durchführen zu können. Drei Methoden stehen hier zur Verfügung:

1. Enzymbestimmung im Homogenat oder Extrakt
2. Histochemische Enzymbestimmung in Gewebeschnitten
3. Ultramikrochemische Enzymbestimmung mit gefriergetrockneten Gewebeschnitten

Am einfachsten ist die Bestimmung von Enzymaktivitäten im Homogenat mit Mikromethoden, die pro Bestimmungsansatz nur 5–10 µl (1 µl = 0,001 ml) eines 5–10%igen Gewebehomogenats verlangen. Stehen zum Beispiel 20 mg Gewebe zur Verfügung, so können mit einem 10%igen Homogenat (200 µl) wenigstens 20 Bestimmungen durchgeführt werden. Steht weniger Gewebe zur Verfügung oder wird eine noch größere Anzahl von Bestimmungen verlangt, so können Ultramikromethoden angewandt werden.

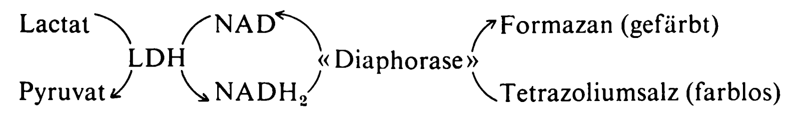
Der histochemischen Enzymbestimmung in Gewebeschnitten liegt folgendes Prinzip zugrunde: In den Zellen aktive Enzyme spalten die im Inkubationsmedium zugeführten Substrate. Um die Enzymreaktion sichtbar werden zu lassen, muß ein Spaltprodukt folgende Eigenschaften haben:

a) Es muß unlöslich sein (oder unlöslich gemacht werden), so daß es am Ort seiner Entstehung im Gewebe niedergeschlagen wird.
b) Es muß gefärbt sein (oder sichtbar gemacht werden).

Beispiele:

Phosphatasen spalten aus Phosphorsäureestern anorganisches Phosphat ab. Durch Bleiionen im Inkubationsmedium wird Phosphat als Bleiphosphat gefällt. Schließlich wird das als Phosphat gefällte Blei durch Behandeln mit Schwefelwasserstoff in schwarzes Bleisulfid überführt. Zum Nachweis von Dehydrogenasen wird entsprechendes Substrat, ein Tetrazoliumsalz und Coenzym im Inkubationsmedium gelöst. Im Gewebe aktive Dehydrogenase reduziert NAD zu $NADH_2$. Im Gewebe ebenfalls vorkommende «Diaphorase» überträgt den Wasserstoff (Elektronen und Protonen) auf das Tetrazoliumsalz, anstatt die Elektronen über die Elektronentransportkette laufen zu lassen. Tetrazolium wird dabei zu gefärbtem Formazan reduziert. Einige Formazane sind unlöslich, andere werden durch Metallionen präzipitiert.

Der Vorgang ist schematisch am Beispiel der Lactatdehydrogenase dargestellt:



Die Bezeichnung «Diaphorase» für das Enzym, das Tetrazolium reduziert, wird in der histochemischen Literatur gebraucht, obwohl Zweifel bestehen, daß ein solches Enzym existiert. Es handelt sich vielmehr um eine Lipoamid-dehydrogenase (Flavoenzym). Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Elektronenübertragung durch das Enzym $NADH_2$-Cytochrom c-reductase katalysiert wird. Als Arbeitsbezeichnung wird auch der Name $NADH_2$-tetrazolium-reductase gebraucht.

Erhebliche Einschränkungen für die Auswertung von histochemischen Enzymnachweisen sind aus dem Diagramm leicht erkennbar. Obwohl optimale Versuchsbedingungen für die Dehydrogenase (im Beispiel Lactatdehydrogenase) in bezug auf Substrat- und Coenzymkonzentration, pH usw. gewählt werden, ist die Indikatorreaktion (Tetrazolium → Formazan) von der Aktivität des Hilfsenzyms (« Diaphorase ») abhängig. Nur wenn das Hilfsenzym im Überschuß vorliegt, kann die tatsächliche Aktivität der Dehydrogenasen geschätzt werden. Die Ablagerung des Formazans erfolgt außerdem nur an den Stellen, an denen das Hilfsenzym lokalisiert ist – und nicht am Wirkungsort der eigentlichen Dehydrogenase. Schließlich muß noch mit Artefakten wie Diffusion und Ablagerung von Formazan an Fetttröpfchen gerechnet werden.

Trotz der aufgezeigten Mängel und Nachteile ermöglichen es die histochemischen Enzymmethoden, einen Überblick zu gewinnen über die Verteilung von Enzymen in Geweben und in einigen Fällen auch in der Zelle.

Besondere Beachtung wird man in Zukunft den Lysosomen zu schenken haben, die möglicherweise einen sensiblen Indikator für den Funktionszustand der Zelle darstellen. In zugrundegehenden Zellen treten Enzyme aus den Lysosomen aus (s. Abb. 13, Seite 56). Saure Phosphatase ist das am einfachsten zu bestimmende Enzym. Histochemisch wird es in den Lysosomen gefunden. Beim Auflösen der Lysosome tritt es ins Cytoplasma aus, und die Färbung für saure Phosphatase ist diffus im Cytoplasma verteilt.

Mit *ultramikrochemischen* Methoden kann die Verteilung von Enzymen in anatomischen Einheiten, zum Beispiel des Nephrons und im Leberläppchen, quantitativ bestimmt werden.

Im wesentlichen besteht die Technik aus folgendem:

a) Exakte mikroskopische Identifizierung der Struktur im gefärbten Gewebeschnitt
b) Mikrosektion der individuellen Zellgruppen in 16 μ dicken, gefriergetrockneten Gewebeschnitten
c) Wiegen der winzigen Gewebepartikel mit Quarzfadenwaagen
d) Enzymbestimmung

Die Enzymbestimmungsmethode ist von höchster Empfindlichkeit, und quantitative Bestimmungen können in Gruppen von 5 oder mehr Zellen durchgeführt werden. Das Gewicht liegt zwischen 5 und 100 mμg (1 mμg $= 1 \times 10^{-9}$ g). Die Inkubation erfolgt in 2–10 μl Medium, und die Reaktionsprodukte werden kolorimetrisch oder fluorimetrisch mit speziell für die Ultramikroanalyse adaptierten Apparaten bestimmt.

LEBER

Physiologische Vorbemerkungen

Die Leber nimmt im intermediären Stoffwechsel eine zentrale Stellung ein. Zwischen Darm und allgemeinen Kreislauf geschaltet, ist sie Durchgangsorgan für viele vom Darm aufgenommene Nahrungsstoffe. Außerdem hat die Leber eine reichliche Blutversorgung durch die Arteria hepatica.

Die Funktionen der Leber lassen sich in vier größere Gruppen einteilen:

1. Speicherung von Nahrungsstoffen und deren Abgabe ans Blut: zum Beispiel Speicherung von Kohlehydraten in Form von Glycogen und Abgabe von Glucose ans Blut, Speicherung von Fett, Speicherung von Eisen, Kupfer, Vitamin B_{12}
2. Synthesen: zum Beispiel Umwandlung von Glucose in Fett, Aminosäuren (Protein) in Glucose, Proteinsynthese, Synthese von Coenzymen, Harnstoff usw., Umwandlung von Zuckern (Galactose usw.) in Glucose
3. Entgiftung: Bildung von Glucuronsäure- und Schwefelsäureestern mit toxischen Substanzen
4. Exkretion: Exkretion von Gallenfarbstoffen, Gallensäuren und Cholesterin in der Galle

Die Leber hat eine sehr starke Regenerationsfähigkeit und eine große funktionelle Reserve. In Versuchstieren regeneriert die Leber zur normalen Größe wenige Wochen nachdem ein Leberlappen entfernt wurde. Im glei-

chen Versuch konnte demonstriert werden, daß 80% des Lebergewebes entfernt werden kann, ohne daß es zu merklichen Leberfunktionsstörungen kommt. Es überrascht daher nicht, wenn Funktionsprüfungen bei fortgeschrittenen anatomischen Veränderungen der Leber normal ausfallen. Dies gilt besonders für langsam fortschreitende chronische Lebererkrankungen, die mit Regeneration von Lebergewebe einhergehen (Zirrhose, Syphilis, maligne Tumoren).

Die Bestimmungen von Veränderungen von Enzymaktivitäten im Blutserum sind gegenwärtig die besten Indikatoren bei Lebererkrankungen. Eine eingehende Diskussion ist im Kapitel über Enzyme im Blutplasma zu finden.

Enzyme in der Leber

Die Verteilung von Enzymen im Leberläppchen wurde mit histochemischen Färbemethoden eingehend untersucht. Quantitative ultramikrochemische Methoden wurden dagegen bisher nur in beschränktem Umfang angewandt. Mit letzteren Methoden werden Gruppen von 10–20 Zellen von

Tabelle 7. Verteilung von Enzymen im Leberläppchen der Ratte (histochemische Methode)

Enzym	Intrazelluläre Lokalisation	Aktivitätsverteilung im Leberläppchen zentral	peripher
Saure P-ase	Lysosome	++	++
Esterase	Lysosome	++	++
	Mikrosome	++++	+++
G-6-P-ase	Mikrosome	(+)	++++
ATP-ase	Mitochondrien	+++	++++
	Zellmembran in Gallengängen	++++	+++++
5-Nucleotidase	Zellmembran in Gallengängen	++	+/−
SUDH	Mitochondrien	(+)	++
β-HBDH	Mitochondrien	+++	++
LDH	Mitochondrien[1]	+++	++
$NADH_2$-Tetrazolium-reductase	Mitochondrien	+++++	++++

[1] LDH ist ein typisches zytoplasmatisches Enzym, wird aber mit der Tetrazoliumtechnik in den Mitochondrien gefunden. Erklärung siehe im Text S. 61.
(Nach einem Diagramm von A. B. Novikoff. Aus: Subcellular Particles. Editor T. Hayashi. The Ronald Press Company, New York 1959.)

Tabelle 8. Enzymverteilungsmuster im Leberläppchen der Ratte

Enzym	Portale Zone	Mittlere Zone	Zentrale Zone
LDH	2295 ± 95[1]	2012 ± 120	1272 ± 60
GPT	172 ± 8	120 ± 12	62 ± 7
GOT	835 ± 32	813 ± 57	773 ± 30
MDH	1219 ± 45	1159 ± 37	1129 ± 37
ICDH	172 ± 5	195 ± 5	205 ± 10
GDH	123 ± 5	125 ± 5	163 ± 7
Alk. P-ase	7 ± 0,3	5 ± 0,5	3 ± 0,3
G-6-PDH	17± 1	15 ± 1	13 ± 0,8
PGI	387 ± 12	330 ± 13	297 ± 10

[1] μMol Substrat umgesetzt pro Gramm Trockengewicht pro Minute ± Standardabweichung. (Nach R. E. Shank et al.: J. Histochem. Cytochem. *7*, 237, 1959.)

verschiedenen Zonen des Leberläppchens aus gefriergetrockneten, etwa 15 μ dicken Organschnitten seziert und auf Enzymaktivitäten analysiert. In Tabelle 7 sind histochemische Ergebnisse von Novikoff an der Rattenleber zusammengestellt. Tabelle 8 gibt quantitative ultramikrochemische Daten von Shank an der Rattenleber wieder. Aus beiden Aufstellungen geht hervor, daß eine Reihe von Enzymen ungleichmäßig in den Leberläppchen verteilt sind. Histochemisch ist vor allem die Aktivitätsanreicherung von Glucose-6-phosphatase im peripheren Läppchenabschnitt hervorzuheben. Die quantitativen Bestimmungen ergaben für LDH und GDH stärkere Aktivität in der portalen (oder peripheren) Zone, während andere untersuchte Enzyme recht gleichmäßig verteilt sind. Bei LDH – dem ein-

Tabelle 9. Enzymverteilungsmuster im Läppchen der gesunden menschlichen Leber

Enzym	Portale Zone	Zentrale Zone
LDH	840[1]	568
GPT	233	195
MDH	440	365
ICDH	382	378
Alk. P-ase	22	31
G-6-PDH	7	9
PGI	470	352

[1] μMol Substrat umgesetzt pro Gramm Trockengewicht pro Minute. (Nach G. R. Morrison et al.: J. Lab. Clin. Med. *65*, 248, 1965.)

zigen in beiden Tabellen aufgeführten Enzym – stimmen histochemische und ultramikrochemische Ergebnisse nicht überein. Über die quantitative Verteilung von Enzymen im menschlichen Leberläppchen ist bisher erst eine Arbeit veröffentlicht worden (Tab. 9). Auch hier wurde höhere Aktivität von LDH in der portalen Zone gefunden.

Im Laboratorium des Verfassers wird eine andere Präparationstechnik angewandt. Anstatt verschiedener Zonen (zentrale, mittlere, periphere) werden schmale Streifen, die von der Zentralvene bis in die periportale Zone reichen, in einem Stück herauspräpariert und dann in kleine, aufeinanderfolgende Stücke mit Gewichten zwischen 10 und 20 mμg zerlegt und auf Enzymaktivität analysiert. Auf diese Weise gelingt es, profilierte Querschnitte für die Enzymaktivitäten in verschiedenen Richtungen im Leberläppchen zu erhalten. Einige Beispiele sind in Abbildung 14 dargestellt.

Die ungleichmäßige Verteilung von LDH und GDH in der Hundeleber ist erstaunlich und bisher unmöglich zu deuten. In der menschlichen Leber sind LDH und GDH gleichmäßiger verteilt. Der Unterschied in der LDH-Aktivität zwischen zentraler und portaler Zone in Tabelle 9 wird hier nicht bestätigt, aber es sind größere Versuchsreihen notwendig, um Gesetzmäßigkeiten zu erkennen.

Es bleibt abzuwarten, ob diese Technik für Diagnostik und Prognose von Lebererkrankungen mit Erfolg wird angewandt werden können. Mit perkutaner Nadelbiopsie gewonnene Gewebeproben (20–30 mg) reichen aus, um neben der histologischen Untersuchung genügend Material für Schnitte zur Enzymanalyse zu erhalten.

Enzymbestimmungen in Leberhomogenaten

In den letzten Jahren hat sich besonders das Ehepaar Schmidt in Marburg mit der Enzymologie der normalen und erkrankten Leber beschäftigt. Aus diesen Untersuchungen geht eindeutig hervor, daß die Bestimmungen von Enzymaktivitäten nicht nur im Gesamthomogenat, sondern auch in fraktionierten Extrakten zur getrennten Bestimmung im cytoplasmatischen Raum (C-Raum) und im mitochondralen Raum (M-Raum) vorgenommen werden sollten. In Tabelle 10 sind die Enzymverteilungsmuster in der gesunden menschlichen Leber und bei akuter Hepatitis gegenübergestellt. Auffallender als Veränderungen der Gesamtaktivität sind Unterschiede in der Verteilung zwischen C-Raum und M-Raum bei Hepatitis. Bei GOT ist die Gesamtaktivität unverändert, aber die Abnahme im M-Raum beträgt über 50%. Während die Abnahme der Gesamtaktivität bei MDH im Gesamthomogenat im Durchschnitt 17% beträgt, ist die Aktivität im M-

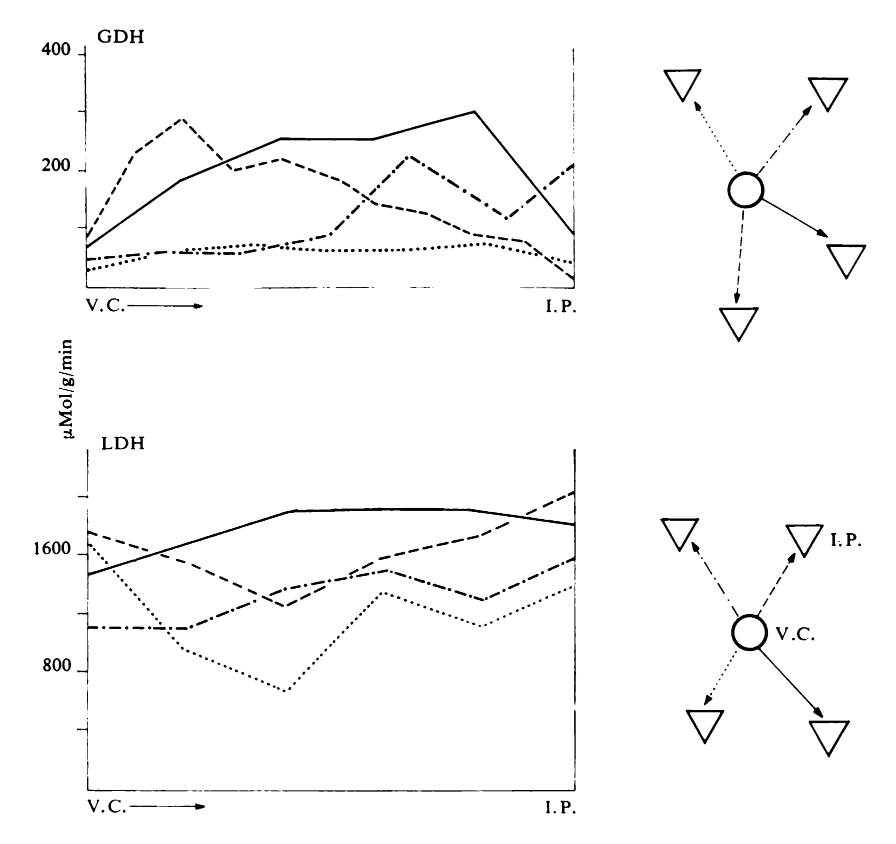


Abb. 14a. LDH- und GDH-Aktivitätsprofile im Leberläppchen vom Hund. Ordinate: Enzymaktivität in µMol pro Gramm Trockengewicht pro Minute (37 °C). Abszisse: Relative Entfernung.
V.C. = Venula centralis. I.P. = Interlobulärer Pfortadertrakt. Rechts sind die Leberläppchen schematisch dargestellt. Die Pfeile zeigen die Richtung an, in welcher schmale Streifen Lebergewebe herauspräpariert wurden (siehe Text).

Raum bei Hepatitis um 90% vermindert. Bei Enzymen, die im M-Raum nur gering aktiv sind (GPT, ENO und PK), verschwindet die Aktivität bei der Hepatitis im M-Raum vollständig.

Die Änderung des Enzymverteilungsmusters bei der akuten Hepatitis wird von einer gleichsinnigen Verschiebung des extrahierten Proteins begleitet. Die Verarmung der Leber an extrahierbarem Protein bei Hepatitis um durchschnittlich 17% geht ganz zu Lasten des Proteins im M-Raum (Tab. 10).

Am Gesamthomogenat gefundene Veränderungen von Enzymaktivitäten bei Lebererkrankungen sind in Tabelle 11 dargestellt, die einer Arbeit

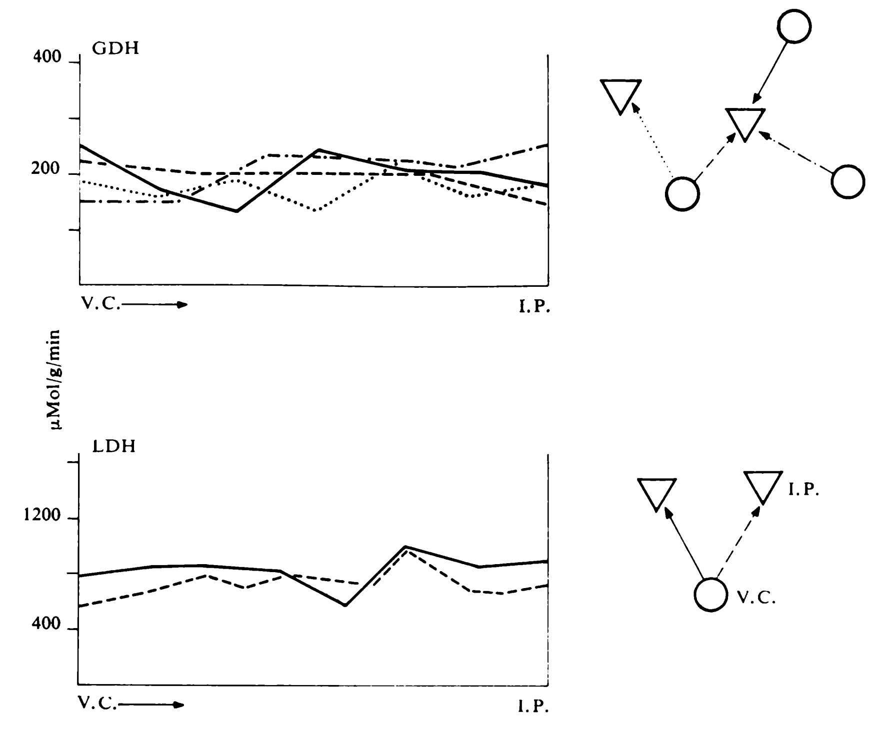


Abb. 14b. LDH- und GDH-Aktivitätsprofile im Leberläppchen des Menschen. (Erklärung siehe Abb. 14a.)

von TASAKE und ISHII entnommen ist und eine Übersicht über die Ergebnisse aus verschiedenen Laboratorien darstellt. Die gefundenen Aktivitätsänderungen sind gering, und der diagnostische und prognostische Wert ist noch zweifelhaft. Der technisch anspruchsvolleren Methode der Fraktionierung in C-Raum und M-Raum ist gegenwärtig unbedingt der Vorzug zu geben.

Speziesunterschiede bei den Enzymen in der Leber sind aus Tabelle 12 (E. und F. W. SCHMIDT) zu ersehen. Es ist noch weitgehend unbekannt, welche Unterschiede im Stoffwechsel des Menschen und der Versuchstiere in den verschiedenen Enzymverteilungsmustern reflektiert werden. Die medizinische Forschung ist auf das Tierexperiment angewiesen, aber Rückschlüsse auf die Physiologie und Pathologie des Menschen müssen mit Vorbehalt gezogen werden. Mit der Einführung der Nadelbiopsie sind Untersuchungen an frischen menschlichen Geweben möglich geworden und werden zunehmend angewandt.

Von entscheidendem Wert sind Enzymuntersuchungen bei genetischen Erkrankungen, die durch das Fehlen eines oder mehrerer Enzyme charak-

Tabelle 10. Enzymverteilungsmuster in der normalen menschlichen Leber und bei akuter Hepatitis

Enzym	Gesamtaktivität[1] gesunde Leber	% der Aktivität C.R.	M.R.	Gesamtaktivität[1] Hepatitis	% der Aktivität C.R.	M.R.
GDH	92	0	100	40	0	100
GOT	95	61	39	98	83	17
GAPDH	75	77	23	90	86	14
ICDH	42	86	14	35	87	13
MDH	143	63	37	118	96	4
GPT	58	89	11	40	100	0
ENO	23	95	5	17	100	0
PK	13	95	5	11	100	0
LDH	151	100	0	122	100	0
Extrahiertes Protein (mg/g)	173	42	58	144	55	45

[1] μMol Substrat umgesetzt pro Gramm Frischgewicht pro Minute.
Leberbiopsien wurden fraktioniert extrahiert und die Enzyme getrennt im cytoplasmatischen Raum (C.R.) und im mitochondrialen Raum (M.R.) bestimmt. (Nach E. Schmidt und F. W. Schmidt: Enzymol. biol. clin. *3*, 73, 1963.)

terisiert sind. Glucose-6-phosphatase oder Amylo-1.6-glucosidase fehlen bei bestimmten Glycogenspeicherkrankheiten. Phenylalanin-hydroxylase bei Phenylpyruvic oligophrenia, Homogenisat-oxydase bei Alkaptonurie, UDPG-transferase bei Galaktosämie, Bilirubintransferase bei Gilberts Krankheit – um einige Beispiele zu nennen. Der Nachweis des Fehlens (oder stark verminderter Aktivität) der entsprechenden Enzyme erleichtert die Diagnose wesentlich. Genetisch bedingte Erkrankungen («inborn errors of metabolism») sind in einem besonderen Kapitel besprochen.

NIERE

Physiologische Vorbemerkungen

Die Nieren haben folgende Funktionen:

1. Regulierung des Wasser- und Elektrolytgleichgewichts und damit des osmotischen Druckes der Körperflüssigkeiten
2. Regulierung des Säure-Basen-Gleichgewichts
3. Ausscheidung unverwertbarer Stoffwechsel-Endprodukte und toxischer Substanzen

Tabelle 11. Verhalten von Enzymaktivitäten in der menschlichen Leber bei verschiedenen Erkrankungen

Enzym	Hepatitis akut	Hepatitis chronisch	Fettleber	Unterernährung	Zirrhosis
Cyt.-oxyd.	↙	↙		(↙)	
LDH	↙		↙	(↙)	↙
SUDH		↙			
G-6-PDH	↗	↗			↗
GPDH	↙	↙			↙
ALD	↙	↙			
G-6-P-ase	↙				↙
ADH	↙				
GDH	↙	↙			↙
GOT	↙	↙		(↙)	
CHE				↙	
Alk. P-ase		↗		–	
Esterase	↙		↙		
ARG		↙	↙		
Catalase	↙	↗	↙		↗

Untersuchungen im Homogenat. Gewebe gewonnen durch perkutane oder offene Biopsie. ↙ verminderte Aktivität ↗ erhöhte Aktivität – unveränderte Aktivität. (Nach S. TASAKE und K. ISHII. Aus: Progress in Liver Diseases. Vol. I. Editors: H. POPPER und F. SCHAFFNER. Grune & Stratton, New York 1961.)

Nierengewebe zeichnet sich durch einen besonders hohen Sauerstoffverbrauch aus, als Ausdruck eines intensiven Intermediärstoffwechsels.

Jede Niere hat etwa 1 200 000 Nephronen. Die Kapillaroberfläche der Glomeruli (Filtrationsfläche) beider Nieren zusammen beträgt ungefähr 1,56 m^2. Pro Minute fließen etwa 1200 ml Blut (700 ml Plasma) durch die Glomeruli und werden 125 ml Primärharn gebildet, während nur 1–2 ml Harn pro Minute die Harnblase erreichen. Pro Tag werden also etwa 170 Liter Flüssigkeit gefiltert, wovon 168,5 Liter rückresorbiert werden. Zusammen mit dem Wasser werden täglich rückresorbiert etwa 1000 g NaCl, 360 g $NaHCO_3$, 170 g Glucose. Ausgeschieden werden etwa 60 g NaCl, Harnstoff und andere Stoffwechselprodukte in annähernd 1,5 l Harn.

Die Blutversorgung der Nieren hat einige Besonderheiten. Das arterielle Blut durchströmt zuerst die Glomeruli und dann das die Tubuli umgebende Kapillarnetz. Jede Einengung der Strombahn (im Extremfall Kapillarverschluß in den Glomeruli) hat eine Verschlechterung der Blutversorgung der Tubuli zur Folge (Ischämie, Anoxie), die bei längerer Dauer (z. B. Glomerulonephritis) zu degenerativen Veränderungen in den Tubuli führt.

Tabelle 12. Enzymverteilungsmuster in der normalen menschlichen Leber und in der Leber von Laboratoriumstieren

Enzym	Mensch			Meerschweinchen			Ratte			Maus		
	Ges. Aktivität[1]	% C.R.	% M.R.	Ges. Aktivität[1]	% C.R.	% M.R.	Ges. Aktivität[1]	% C.R.	% M.R.	Ges. Aktivität[1]	% C.R.	% M.R.
GDH	92	0	100	130	0	100	14	0	100	6	0	100
GOT	95	61	39	57	39	61	94	41	59	93	44	56
MDH	143	63	37	287	53	47	405	79	21	529	90	10
HK	25	68	32	15	23	77	21	36	64	23	38	62
GAPDH	75	77	23	37	100	0	121	100	0	69	100	0
ICDH	42	86	14	69	66	34	18	94	6	19	90	10
GPT	58	89	11	2	100	0	24	100	0	27	100	0
ENO	23	95	5	10	100	0	15	100	0	11	100	0
PK	13	95	5	9	100	0	35	100	0	14	100	0
LDH	151	100	0	78	100	0	413	100	0	359	100	0
ALD	6	100	0	4	74	26	10	81	19	8	81	19
GPDH	33	100	0	26	100	0	35	100	0	27	88	12
ADH	30	100	0	38	100	0	8	100	0	26	100	0
PFA	3	100	0	1	76	24	4	83	17	3	74	26
ZF	1	100	0	<1	100	0	1	100	0	1	100	0
PGDH	1	100	0	1	100	0	2	100	0	1	100	0

[1] μMol Substrat umgesetzt pro Gramm Frischgewicht pro Minute. (Nach E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT: Enzymol. biol. clin. *3*, 73, 1963.)

Das die Tubuli erreichende Blut hat einen höheren kolloidosmotischen Druck als das arterielle Blut, da in den Glomeruli 18–20% des Wassers aus dem Plasma filtriert wurden. Durch den erhöhten kolloidosmotischen Druck wird die in den Tubuli stattfindende Rückresorption von Wasser erleichtert.

«Aktiver» Transport

Die Urinbereitung ist das Resultat von drei Vorgängen im Nephron:

1. Filtration im Glomerulus – es entsteht ein proteinfreies Ultrafiltrat des Plasmas
2. Rückresorbierung von Wasser und gelösten Substanzen in den verschiedenen Abschnitten der Tubuli
3. Sekretion von gelösten Substanzen in die Tubuli

Die Filtration im Glomerulus ist ein mechanischer Vorgang, bestimmt durch den effektiven Filtrationsdruck oder die Differenz zwischen dem ka-

pillaren Blutdruck und der Summe von onkotischem Druck und Druck in der Bowmanschen Kapsel.

Rückresorbierungs- und Sekretionsvorgänge im Tubulus sind dagegen zum Teil «aktive» Vorgänge, die eine entsprechende Energiezufuhr durch den intermediären Stoffwechsel der Tubuluszellen erfordern. Von «aktivem» Transport wird gesprochen, wenn der Transport einer Substanz gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgt! (z.B. geringe Konzentration außen, ansteigende Konzentration innen.)

Alle bisher untersuchten Enzyme und Enzymsysteme des intermediären Stoffwechsels zeigen, in Übereinstimmung mit diesen Verhältnissen, wesentlich geringere Aktivität in den Glomeruli im Vergleich zu den übrigen anatomischen Einheiten des Nephrons (s. Tab. 14).

Jede lebende Zelle befindet sich im aktiven Gleichgewicht mit dem sie umgebenden Medium, und «aktive» Prozesse regulieren die chemische Konstanz des intrazellulären Milieus. Nierenzellen nehmen insofern eine Sonderstellung ein, als sie an zwei verschiedene extrazelluläre Flüssigkeiten grenzen – den Urin auf der tubulären und die extravaskuläre Flüssigkeit auf der vaskulären Seite. Für den aktiven Transport von gelösten Substanzen durch Zellmembranen stellt man sich einen «Carrier» vor, an den die zu transportierende Verbindung auf der einen Seite der Membran gebunden wird, um nach Durchtritt durch die Membran an der anderen Seite wieder freigesetzt zu werden. Im Fall von Austauschtransportsystemen – zum Beispiel wird Na^+ aus dem Tubuluslumen resorbiert und K^+ ausgeschieden – könnte ein und derselbe Carrier für beide Transporte verantwortlich sein. Über die Natur solcher Carrier ist wenig bekannt, und keine der verschiedenen Hypothesen ist bewiesen.

Nierenzellen sind mit den Enzymsystemen für den intermediären Stoffwechsel von Kohlehydraten, Fetten und Aminosäuren ausgerüstet. Noch ist aber nicht bekannt, wie der aktive Transport enzymatisch katalysiert wird. Als direkte Quelle für aktive Transportleistungen ist Adenosintriphosphat (ATP) anzusehen. Vergiftung (Entkoppelung) der oxydativen Phosphorylierung hat Sistieren des aktiven Transports zur Folge. Für den Na^+- und K^+-Transport wurde kürzlich eine ATP-ase verantwortlich gemacht, die sowohl von Na^+ als auch von K^+ aktiviert wird, aber es liegen noch keine Untersuchungen darüber vor, ob diese spezifische ATP-ase in der Niere bei Störungen der Nierenfunktion in ihrer Aktivität vermindert ist. Sicher spielen für Rückresorbierung und Sekretion die Umsatzgeschwindigkeit einzelner Substrate, die aus dem peritubulären Milieu aufgenommen werden, eine gewisse Rolle. Der Citrat-Zyklus in den Tubulus-

zellen hat, neben der grundlegenden Funktion im Energiestoffwechsel, anscheinend noch Aufgaben bei der tubulären Sekretion von organischen Säuren. Citrat und 2-Oxo-glutarat werden, ihrer Plasmakonzentration entsprechend, im Glomerulus gefiltert und teilweise in den Tubuli rückresorbiert. Dort werden sie zum Malat metabolisiert und als solches wieder in den Urin abgegeben. Tubuluszellen sind aber auch in der Lage, Citrat und 2-Oxo-glutarat in den Urin zu sezernieren. Bei Alkalosis nimmt die tubuläre Sekretion von organischen Säuren des Citrat-Zyklus zu, vielleicht als Austauschdiffusion gegen Chloridionen, um diese bei Alkalosis zu konservieren. Erhöhtes pH bei Alkalosis begünstigt vielleicht die Bildung von Citrat durch eine pH-bedingte Aktivitätssteigerung des citratbildenden Enzyms (Citrat-synthase. Reaktion 2 in Abb. 8).

Aminosäuren werden entsprechend ihrer Konzentration im Plasma im Glomerulus filtriert und in den Tubuli rückresorbiert. Die Kapazität der Tubuli zur Rückresorbierung von Aminosäuren ist hoch. Selbst bei 10–15-facher Erhöhung des Plasmaspiegels (durch intravenöse Infusion) einzelner Aminosäuren werden diese noch quantitativ rückresorbiert. Allerdings bestehen Unterschiede zwischen den Aminosäuren. Am vollständigsten werden bei Belastung die essentiellen Aminosäuren rückresorbiert. In Clearanceversuchen wurde festgestellt, daß einige Aminosäuren die Rückresorbierung anderer Aminosäuren hemmen, und man nimmt eine Konkurrenz um einen Carrier an, der zum Transport durch die Zellmembran erforderlich ist. Wahrscheinlich existieren mehrere Transportmechanismen, die gruppenspezifisch sind für basische, neutrale und saure Aminosäuren. Einzelheiten, besonders über die Natur der Carrier und der am Transport direkt beteiligten Enzymsysteme, sind noch nicht bekannt. Möglicherweise spielen die Transaminasen (Alanin-aminotransferase und Aspartat-aminotransferase) eine Rolle beim aktiven Aminosäuretransport. Es liegen auch Hinweise vor, daß Pyridoxalphosphat am Transportmechanismus beteiligt ist.

Mikropunktion des Nephrons

Es ist schwierig, die verschiedenen Resorbierungs- und Sekretionsvorgänge im Nephron zu lokalisieren. Durch Mikropunktion der verschiedenen anatomischen Abschnitte des Nephrons gelingt es, Bruchteile eines µl Urin zu gewinnen, und diese können mit chemischen Ultramikromethoden analysiert werden. Auf diese experimentell sehr diffizile Weise wird es gelingen, ein mehr und mehr vollständiges Bild zu gewinnen. Bisher ist man zu folgenden, experimentell recht gut gesicherten Anschauungen gekommen:

Im proximalen Tubulusabschnitt werden 80–90% des im Glomerulus gefilterten Na^+ und Cl^- aktiv rückresorbiert, gleichzeitig werden etwa 90% des gefilterten Wassers iso-osmotisch passiv rückresorbiert, und etwa 16 ml eines iso-osmotischen Urins verlassen die proximalen Tubuli pro Minute.

In der Henleschen Schleife findet aktive Rückresorbierung von Na^+ statt, ohne daß gleichzeitig Wasser mittransportiert wird. Demzufolge wird der Urin in diesem Abschnitt hypotonisch, während entsprechend die interstitielle Flüssigkeit im Nierenmark hypertonisch wird. Wasserrückresorbierung im distalen Tubulusabschnitt und im Sammelrohr wird durch das antidiuretische Hormon reguliert. In seiner Abwesenheit sind beide Abschnitte relativ undurchlässig für Wasser, während in seiner Gegenwart Wasser rückresorbiert und der Urin konzentriert wird. Im distalen Tubulusabschnitt ist der Wassertransport iso-osmotisch, und im Sammelrohr erfolgt er, entsprechend dem iso-osmotischen Gradienten, in die umgebende hypertonische interstitielle Flüssigkeit des Nierenmarks. Na^+ wird im distalen Tubulusabschnitt aktiv rückresorbiert, und zwar im Austausch gegen K^+ und H^+.

Im Glomerulus gefiltertes Kalium unterliegt der vollständigen Rückresorbierung im proximalen Tubulus. Im distalen Tubulus findet Exkretion im molaren Austausch gegen Natrium statt. Entsprechend ist die Menge an ausgeschiedenem Kalium abhängig von der Menge an rückresorbiertem Na^+. Gesteigerte Na-Rückresorbierung (z.B. unter Einfluß von Aldosteron) führt zu vermehrter Kaliumausscheidung im Urin. Wasserstoffionen werden sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulusabschnitt an den Urin abgegeben. Da sich aber im proximalen Teil das pH des Urins nicht wesentlich ändert, wird die H^+-Sekretion mit der Rückresorbierung von Bicarbonat in Verbindung gebracht. Und zwar reagieren H^+ und HCO_3^- zu der sehr schwach dissoziierenden H_2CO_3, die langsam spontan in H_2O und CO_2 zerfällt. CO_2 wird rückresorbiert. Im distalen Tubulus hingegen werden Wasserstoffionen gegen Natriumionen ausgetauscht, die H^+-Konzentration im Urin nimmt zu, der Urin wird sauer. Wasserstoffionen werden in den Tubuluszellen gebildet, und zwar durch Kohlensäureanhydrase (CA).

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Man kann die Verhältnisse so formulieren, daß CA durch die Bildung von Wasserstoffionen indirekt die Rückresorbierung von Bicarbonationen im proximalen Tubulus katalysiert, während die Bildung von H^+ im distalen

Tubulus direkt zur Säuerung des Urins führt. Wie oben erwähnt wurde. findet im distalen Tubulus Austausch von Na^+ gegen K^+ und H^+ statt, und zwar auf molarer Basis. K^+ und H^+ konkurrieren um den Transport. Sind Kaliumionen im Überschuß vorhanden, so tritt die Wasserstoffionenausscheidung zurück, der Urin wird alkalisch. Herrscht Kaliummangel oder Überschuß an Wasserstoffionen, so wird vermehrt H^+ ausgeschieden, und der Urin wird sauer.

In diesem Zusammenhang muß schließlich noch die Ammoniakausscheidung erwähnt werden. NH_3 wird in Tubuluszellen gebildet, und zwar zum größten Teil aus Glutamin (Glutaminasen). NH_3 kann anscheinend frei durch die Zellmembran diffundieren und wird in den Urin abgegeben. Die Zellmembran ist hingegen undurchlässig für NH_4-Ionen. Durch CA in der Zelle gebildete und gegen Na^+ ausgetauschte H^+ verbinden sich im Urin mit NH_3 zu NH_4^+. Indirekt ist also CA auch an der Ammoniakausscheidung beteiligt, die wohl vornehmlich in den distalen Tubuli stattfindet. Die entscheidende Rolle der CA bei der Bicarbonatrückresorbierung, der Ammoniakausscheidung und der Ansäuerung des Urins wird durch die Tatsache unterstrichen, daß Inhibitoren der CA alle drei Vorgänge hemmen und, da kein H^+ gebildet wird, vermehrt K^+ gegen Na^+ ausgetauscht und in einem alkalischen Urin ausgeschieden wird.

Nierenfunktion und Enzymologie des Nephrons

Es war seit einigen Jahren bekannt, daß die Nierenrinde reich an CA ist, aber erst kürzlich wurde im Laboratorium des Verfassers die quantitative Verteilung dieses Enzyms im Nephron untersucht. In der normalen Niere (Mensch und Hund) ist die Aktivität der CA am höchsten im distalen Tubulus. Werden Hunde durch Verfütterung von NH_4Cl azidotisch gemacht, so kann eine Zunahme der CA-Aktivität im proximalen Tubulus gemessen werden. Dieser Befund steht im Einklang mit Mikropunktionsversuchen anderer Autoren, die feststellten, daß im azidotischen Tier Azidifizierung des Urins bereits im proximalen Tubulusabschnitt stattfindet. Die Verteilung der Glutaminasen im Nephron konnte bisher noch nicht untersucht werden, da diese Enzyme bei der Gefriertrocknung der Nierenschnitte inaktiviert werden. Die Enzymbestimmungen müssen also vorerst auf Frischhomogenate beschränkt bleiben.

Um die zonale Verteilung der Glutaminasen in der Niere untersuchen zu können, werden zirka 1 mm dicke, frische Nierenschnitte unter dem Präparationsmikroskop in Cortex, äußere Medulla, innere Medulla und Papille zerlegt und die Gewebe homogenisiert. Die Tabelle 13 beschreibt

Tabelle 13. Verteilung der Glutaminasen in der Niere von Mensch, Hund und Ratte

I = Glutaminase I, aktiviert durch Phosphat
II = Glutaminase II, aktiviert durch Pyruvat
III = nicht aktivierbare Glutaminase

	I	II	III
Mensch			
Cortex	250[1]	68	32
Übergangszone Cortex–Medulla	158	38	20
Papille	33	15	10
Hund			
Cortex	250	33	25
Äußere Medulla	150	} 17	13
Innere Medulla	67		
Papille	33	13	25
Ratte			
Cortex	167	33	17
Äußere Medulla	130	47	33
Innere Medulla	246	58	30
Papille	180	92	53

[1] μMol Substrat umgesetzt pro Gramm Trockengewicht pro Minute (37 °C). 1 Menschenniere, 2 Hundenieren, 6 Rattennieren. Untersuchungen aus dem Laboratorium des Verfassers (Methode: H. MATTENHEIMER und H. DEBRUIN: Enzymol. biol. clin. *4*, 65, 1964).

die Verteilung von Glutaminase I (aktiviert durch Phosphat), Glutaminase II (aktiviert durch Pyruvat) und von nichtaktivierbarer Glutaminase in der Niere von Mensch, Hund und Ratte. Die Speziesunterschiede in der Enzymverteilung sind erheblich. Beim Menschen und beim Hund sind die Aktivitäten aller drei Glutaminasen im Cortex am höchsten und nehmen zur Papille hin erheblich ab. Bei der Ratte ist Glutaminase I in allen Abschnitten hoch, mit einem Maximum in der inneren Medulla. Glutaminase II und nichtaktivierbare Glutaminase nehmen bei der Ratte vom Cortex zur Papille zu.

Im Versuch mit Ratten wurde schon vor einiger Zeit festgestellt, daß beim azidotischen Tier die Aktivität der Glutaminase I mit zunehmender Ammoniakausscheidung parallel ansteigt. Beim Hund läßt sich, trotz erhöhter Ammoniakausscheidung während der Azidose, eine Aktivitätszunahme der Glutaminasen nicht nachweisen.

Im Laboratorium des Verfassers wurde das unterschiedliche Verhalten von Hund und Ratte eingehend untersucht und gefunden, daß die Hundeniere genügend Reserve an Glutaminaseaktivität besitzt, um die erhöhte NH_3-Produktion während der Azidose zu gewährleisten, während dies bei der Rattenniere nicht der Fall ist. Folglich kommt es bei der Ratte zu einem adaptativen Anstieg der Glutaminase I.

Schon vor mehr als 20 Jahren hat VAN SLYKE beschrieben, daß etwa 60% des Ammoniaks im Urin vom Glutamin stammt. Diese Versuche wurden kürzlich von PITTS und seinen Mitarbeitern bestätigt. Die restlichen 40% NH_3 werden, wie die oben beschriebenen Versuche am Hund ergaben, aus Glutamat mit Hilfe der Glutamat-dehydrogenase gebildet.

Berichte in der älteren Literatur, wonach die menschliche Niere nur geringe Glutaminaseaktivität besitzt, sind falsch, da die meisten Untersuchungen an Autopsienieren durchgeführt wurden, die Glutaminasen aber zwei Stunden nach dem Tode kaum noch nachweisbar sind. Wird durch Nadelbiopsie gewonnenes Nierengewebe von Patienten unverzüglich homogenisiert und zur Glutaminasebestimmung verwendet, so wird die Aktivität in gleicher Größenordnung wie bei Tieren gefunden (Tab. 13).

Ob es beim Menschen während einer Azidose zu einem Anstieg der Glutaminaseaktivität in der Niere kommt, ist noch nicht bekannt.

Die quantitative Verteilung verschiedener Dehydrogenasen und Aminotransferasen im Nephron der gesunden menschlichen Niere ist in Tabelle 14 wiedergegeben. Die Enzymverteilungsmuster sind außerdem in Abbildung 15 veranschaulicht. Die Aktivitäten aller bisher untersuchten Enzyme, einschließlich der früher in unserem Laboratorium gemessenen Phosphatasen (BONTING et al., in die Tabelle nicht aufgenommen), sind in den Glomeruli deutlich geringer als in den corticalen Abschnitten der Tubuli. Die einzige Ausnahme bildet die saure Phosphatase, deren Aktivität im Glomerulus höher ist als in den übrigen Strukturen des Nephrons.

Die höchste Aktivität wird in den proximalen Konvoluten, distalen Konvoluten oder in den Markstrahlen gefunden. Zur Papille hin fallen die Aktivitäten deutlich ab. Es ist bisher nicht mit Sicherheit gelungen, Sammelröhrchen aus den Markstrahlen oder dem Nierenmark frei von anderen Strukturen zu präparieren. Die Sammelröhrchen sind in den ungefärbten, gefriergetrockneten Nierenschnitten, aus denen die anatomischen und funktionellen Zellgruppen präpariert werden, schlecht zu differenzieren. Sollte die Sektion in Zukunft noch möglich werden, so kann sich das Bild der Enzymverteilungsmuster natürlich noch ändern.

Tabelle 14. Normale Enzymverteilungsmuster im Nephron der menschlichen Niere. Aktivitäten ausgedrückt in µMol/g Trockengewicht × Minute bei 37 °C. Mittelwerte von [ ] Patienten ± Standardabweichung

	LDH	MDH	GDH	AspAT	AlAT	CA[2]
Glomeruli	636 ± 209 [10] (407–1069)[1]	622 ± 152 [6] (428–858)	12 ± 4 [6] (7–18)	85 ± 45 [5] (27–142)	17 ± 13 [6] (5–45)	88 451 ± 44 225 [6] (37 907–157 948)
Proximale Konvolute	1405 ± 352 [11] (1067–2217)	1548 ± 232 [6] (1313–1978)	82 ± 27 [6] (48–108)	292 ± 47 [6] (240–347)	112 ± 65 [6] (37–188)	176 902 ± 56 861 [6] (126 358–277 988)
Distale Konvolute	1202 ± 291 [11] (530–1584)	1559 ± 276 [6] (1300–2013)	77 ± 35 [6] (38–120)	427 ± 125 [6] (212–552)	85 ± 57 [6] (30–177)	284 306 ± 113 722 [6] (151 630–410 665)
Markstrahlen	1336 ± 445 [7] (915–1972)	1748 ± 45 [4] (1208–2314)	75 ± 23 [5] (44–98)	308 ± 82 [5] (202–410)	177 ± 95 [5] (35–267)	56 861 ± 18 953 [6] (37 907–94 768)
Mark äußere Zone	1166 ± 338 [6] (817–1715)	1313 ± 255 [4] (909–1681)	47 ± 25 [5] (20–74)	317 ± 128 [4] (128–402)	127 ± 113 [5] (27–268)	120 040 ± 75 815 [5] (50 543–233 762)
Mark innere Zone	1118 ± 594 [6] (580–2120)	1162 ± 255 [5] (823–1382)	27 ± 12 [5] (14–38)	272 ± 195 [4] (68–528)	38 ± 22 [5] (10–70)	94 768 ± 37 907 [5] (31 589–138 994)
Papilla	913 ± 278 [4] (584–1259)	506 ± 209 [3] (317–731)	15 ± 7 [3] (6–20)	67 [2]	37 ± 20 [3] (20–60)	50 543 [2]

[1] ( ) Bereich [2] Aktivität bei 0 °C

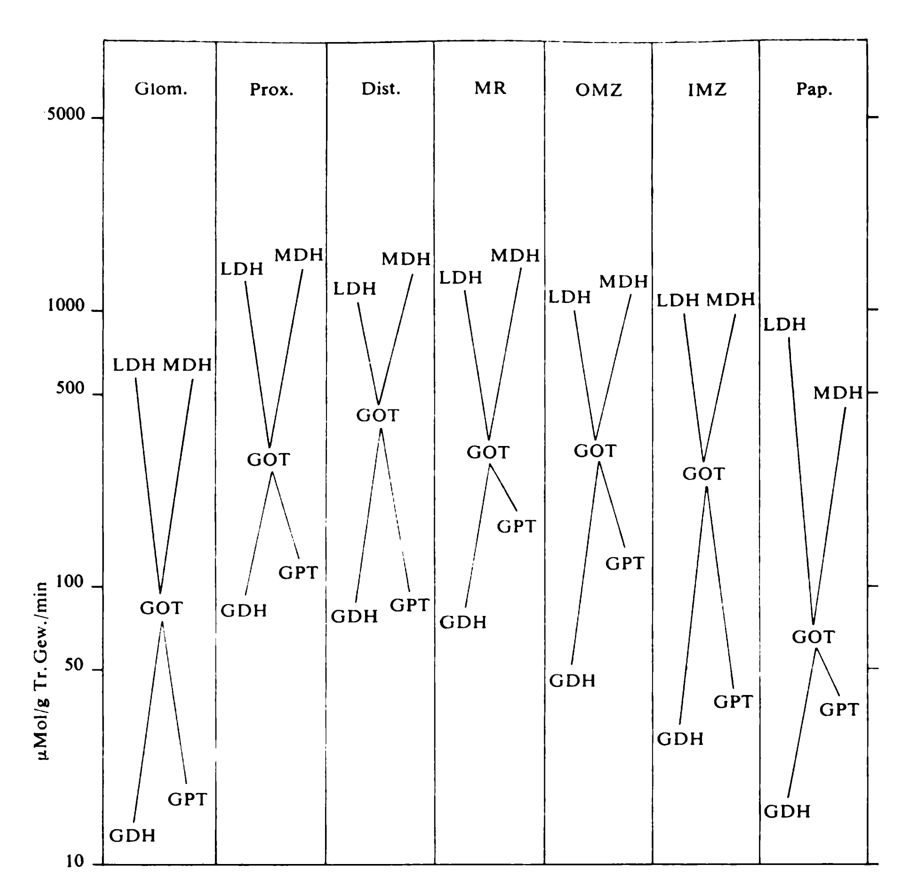


Abb. 15. Quantitatives Enzymverteilungsmuster im Nephron der Menschenniere. Ordinate: Enzymaktivität in μMol pro Gramm Trockengewicht pro Minute (37 °C), logarithmischer Maßstab.
Glom. = Glomeruli, Prox. = proximale Konvolute, Dist. = distale Konvolute, MR = Markstrahlen, OMZ = äußere Zone der Medulla, IMZ = innere Zone der Medulla, Pap. = Papille.

Die Aktivität der Kohlensäureanhydrase (CA) ist um 3–4 Größenordnungen höher als die der übrigen gemessenen Enzyme. Aus technischen Gründen wird die Bestimmung der CA-Aktivität bei 0 °C vorgenommen (Werte in der Tabelle). Nach Angaben in der Literatur ist die Aktivität bei 37 °C 3- bis 4mal größer. Wird die auf 37 °C umgerechnete Aktivität mit der Produktion und Ausscheidung von Wasserstoffionen im Nephron in Beziehung gesetzt, so stellt sich ein 1000- bis 3000facher Überschuß an CA-Aktivität heraus. Ob dieser Überschuß tatsächlich auch in der Zelle

vorliegt, läßt sich augenblicklich noch nicht sagen, da wir keine Kenntnis über die intrazelluläre Regulierung der CA-Aktivität haben.

CA wird durch Diuretika wie Acetazolamid (Diamox) gehemmt. Als direkte Folge der verminderten oder ganz aufgehobenen Bildung und Exkretion von Wasserstoffionen wird der Urin alkalisch, und die Rückresorption von Bicarbonat und Na^+ ist stark vermindert. K^+ wird vermehrt ausgeschieden, da es H^+ bei der im Austausch erfolgenden Rückresorption von Na^+ ersetzt. Schließlich kommt es zur Azidose.

Im Laboratorium des Verfassers wurden die erwähnten Enzyme im Nephron von drei Patienten mit renaler tubulärer Azidose untersucht. Bei dieser Erkrankung ist die Ausscheidung von Wasserstoffionen im Nephron gestört, und das pH des Urins sinkt auch bei Säurebelastung nicht unter 6,5. Im übrigen verhalten sich Bicarbonat, Na^+ und K^+ im Urin ganz ähnlich wie bei der Hemmung der CA durch Diamox. In allen drei Fällen wurde aber eine normale CA-Aktivität im Nephron gefunden. Das schließt natürlich eine, in vitro nicht erfaßbare, Hemmung der Enzymaktivität in der intakten Zelle nicht aus. Daneben besteht die Möglichkeit, daß die Wasserstoffionenproduktion normal verlaufen kann, aber der Transport durch die Zellmembran gestört ist. Auf jeden Fall läßt das Versuchsergebnis den Schluß zu, daß das Krankheitsbild der renalen tubulären Azidose nicht durch ein Fehlen der Kohlensäureanhydrase bedingt ist. Die untersuchten Dehydrogenasen waren ebenfalls normal. Von einer Patientin wurden auch die Glutaminasen bestimmt. Die Aktivitäten lagen im Normalbereich.

Untersuchungen am Nephron von 5 Fällen mit Kaliummangelsyndrom verschiedener Genese zeigten einen deutlichen Anstieg der LDH-Aktivität in den corticalen Tubulusabschnitten. Elektronenmikroskopisch wurden morphologische Veränderungen der Mitochondrien gefunden. Bei der experimentellen Hypokalämie in der Ratte war früher in unserem Laboratorium von BONTING und MUEHRCKE ein Anstieg der LDH-Aktivität in der Medulla der Niere beobachtet worden. Auch hier wurden morphologische Veränderungen der Mitochondrien gefunden, und zwar diesmal in der Medulla. Es ist also durchaus möglich, daß zwischen der morphologischen Veränderung der Mitochondrien und der erhöhten LDH-Aktivität beim Kaliummangelsyndrom ein Zusammenhang besteht.

BONTING et al. untersuchten die alkalische Phosphatase und die LDH bei 13 Patienten mit Lupus-Nephritis und fanden folgende Veränderungen der Aktivitäten im Nephron: Die alkalische Phosphatase war in den proximalen und distalen Konvoluten bei Lupus-Glomerulitis und Lupus-Glomerulonephritis signifikant erniedrigt. Die LDH-Aktivität war erhöht

bei der Lupus-Glomerulonephritis, aber normal bei der Lupus-Glomerulitis.

Schließlich sollen noch Untersuchungen über die Glutaminasen bei Patienten mit Gicht erwähnt werden. GUTMAN hatte vor zwei Jahren die Hypothese aufgestellt, daß bei der Gicht möglicherweise die Glutaminasen in der Niere fehlen oder in ihrer Aktivität stark erniedrigt sind. Glutamin steuert seinen Amidostickstoff zur Harnsäuresynthese bei. Durch das Fehlen der Glutaminasen sollte Glutamin angereichert werden und vermehrt zur Harnsäuresynthese beitragen. Im Laboratorium des Verfassers wurden daraufhin die Glutaminasen in frischen Homogenaten aus Nierenpunktaten von vier Patienten mit Gicht untersucht. Die Aktivitäten der Glutaminasen waren bei allen Patienten im Normalbereich. Eine Hemmung der Glutaminase-Aktivität in vivo, die in vitro nicht erfaßt wird, ist unwahrscheinlich, da die Patienten normale NH_3-Ausscheidung hatten.

Über systematische Untersuchungen von Enzymen in der Niere bei Nephropathien liegen bisher nur wenige Veröffentlichungen vor. Die Ergebnisse sind zum Teil sehr widersprechend und schwer zu deuten, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden soll.

LITERATUR

A. B. NOVIKOFF: Approaches to the in vivo function of subcellular particles. In: Subcellular Particles. Herausgeber: T. HAYASHI. The Ronald Press Company, New York 1959.

Progress in Liver Diseases, Vol. I. Herausgeber: H. POPPER und F. SCHAFFNER. Grune & Stratton, New York und London 1961.

S. TASAKE und K. ISHIU: Hepatic enzymes in liver disease. S. 229.

H. MATTENHEIMER und R. M. KARK: Histochemistry and ultramicrochemistry of enzymes of the liver. S. 240.

E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT: Das Verteilungsmuster einiger Enzyme in der menschlichen Leber und seine Veränderungen unter Zellschädigung. Enzymol. biol. clin. *3*, 73, 1963.

R. E. SHANK, G. MORRISON, C. H. H. CHENG, I. KARL und R. SCHWARTZ: Cell heterogeneity within the hepatic lobule. J. Histochem. Cytochem. *7*, 237, 1959.

G. R. MORRISON, I. E. KARL, R. SCHWARTZ und R. E. SHANK: The quantitative histochemistry of the normal human liver lobule. J. Lab. Clin. Med. *65*, 248, 1965.

S. J. BONTING und I. M. ROSENTHAL: Effects of the method of tissue preparation on the assay of tissue enzyme activities. Nature *185*, 686, 1960.

O. LOWRY: The chemical study of single neurons. The Harvey Lectures, Series *58*. Academic Press, New York 1963.

W. D. LOTTSPEICH: Metabolic Aspects of Renal Function. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois USA 1959.

R. F. Pitts: Physiology of the kidney and body fluids. Year Book Medical Publishers, Chicago 1963.

V. E. Pollak und H. Mattenheimer: Enzyme activity in the nephron. Quantitative study by ultramicrochemical techniques. Arch. Int. Med. *109*, 473, 1962.

H. Mattenheimer, V. E. Pollak, R. C. Muehrcke und R. M. Kark: Quantitative Enzymverteilungsmuster im Nephron. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. *70*, 579, 1964.

V. E. Pollak, H. Mattenheimer, H. DeBruin und K. J. Weinmann: Experimental metabolic acidosis: The enzymatic basis of ammonia production by the dog kidney. J. Clin. Inv. *44*, 169, 1965.

S. L. Bonting, A. D. Tsoodle, H. DeBruin und B. R. Mayron: Quantitative histochemistry of the nephron. VII. Various phosphatases in the healthy human kidney. Arch. Biochem. Biophys. *91*, 130, 1960.

V. E. Pollak, S. L. Bonting, R. C. Muehrcke und R. M. Kark: Quantitative histochemistry of the nephron. V. Alkaline phosphatase and lactic dehydrogenase activities in lupus nephritis. J. Clin. Invest. *39*, 1394, 1960.

R. C. Muehrcke und S. L. Bonting: Effect of potassium depletion on lactic dehydrogenase activity in the rat nephron. Nature *196*, 70, 1962.

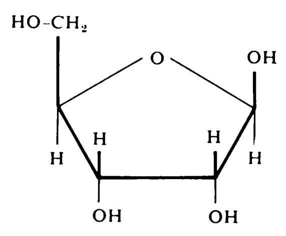
A. B. Gutman und Ts'ai-Fan Yu: An abnormality of glutamine metabolism in primary gout. Am. J. Med. *35*, 820, 1963.

PROTEINSYNTHESE UND BIOCHEMISCHE GENETIK

In den letzten Jahren sind den Biochemiker, Biologen und Mediziner gleichermaßen interessierende Fortschritte bei der Aufklärung der Biosynthese von Proteinen und Nucleinsäuren gemacht worden. Zugleich wurde eine Brücke zur Genetik geschlagen, indem die genetische Formen tragende Substanz in den Genen, die Desoxyribonucleinsäure, als Schablone für die Proteinsynthese erkannt wurde. Genmutationen führen zu Defekten bei der Proteinsynthese, und es ist möglich geworden, die Übertragung von Erbanlagen auf der molekularen Ebene zu verstehen und zu erklären. Ältere Arbeiten mit Mutanten von Mikroorganismen und Insekten und Versuche über den Einfluß des Zellnucleus auf die Proteinsynthese ließen solche Zusammenhänge bereits erkennen.

NUCLEINSÄUREN

Nucleinsäuren sind Verbindungen mit hohem Molekulargewicht und sind aus Purin- und Pyrimidinbasen (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil), Pentose und Phosphorsäure im Verhältnis 1:1:1 aufgebaut. Nach Art der Pentose werden zwei Nucleinsäuretypen unterschieden: Ribonucleinsäuren (RNS) enthalten Ribose und Desoxyribonucleinsäuren (DNS) Desoxyribose (s. Abb. 16). Die strukturelle Grundeinheit der Nu-



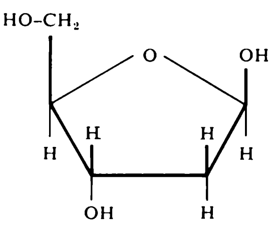


Abb. 16. Ribose (links) und Desoxyribose.

cleinsäuren sind Mononucleotide, die über Pentose und Phosphorsäure miteinander verbunden sind (Abb. 17).

In der Zelle kommt DNS ausschließlich im Nucleus vor, während RNS im Nucleus (und zwar im Nucleolus) und im Cytoplasma gefunden wird. DNS ist an die Chromosomen gebunden und ist der wesentliche Bestandteil der Gene. Nucleinsäuremoleküle bestehen aus zwei durch Wasserstoff-

Abb. 17. Teil einer Nucleinsäurekette.
A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin.

brücken miteinander verbundenen Polynucleotiden. Dabei liegen sich Adenin in der einen und Thymin (oder Uracil) in der anderen Kette, und Guanin und Cytosin gegenüber (s. Abb. 18). Die beiden parallelen Ketten sind zu einer Doppelhelix umeinander gedreht. Die Sequenz der Basen bestimmt die Spezifität einer Nucleinsäure.

REPLIKATION DER DNS UND BIOSYNTHESE DER RNS

Die gegenwärtige, experimentell belegte Anschauung über die Replikation der DNS ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt. An einem Ende tritt

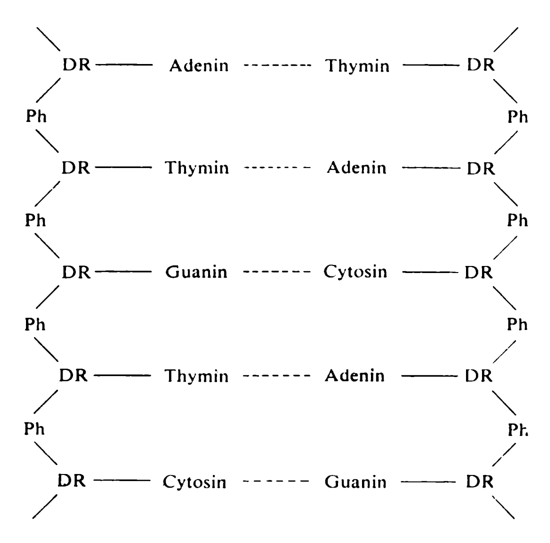


Abb. 18. Schema eines Bruchstücks eines Desoxyribonucleinsäuremoleküls.
DR = Desoxyribose, Ph = Phosphorsäure, ---- = Wasserstoffbrücken.

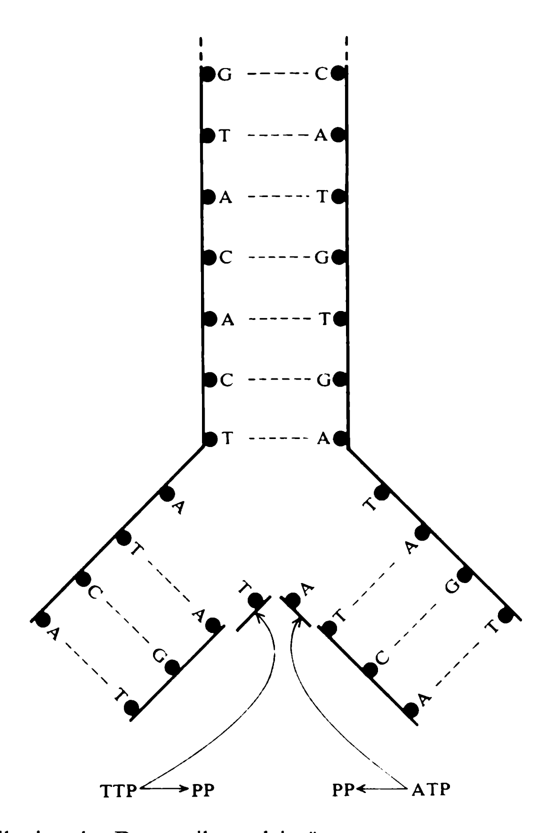


Abb. 19. Replikation der Desoxyribonucleinsäure.
TTP = Thymidin-triphosphat, ATP = Adenosin-triphosphat, PP = Pyrophosphat. Erklärungen siehe Text.

die Doppelkette auseinander, und an jedem Polynucleotid wird eine neue, in bezug auf die Basen komplementäre Kette aus Mono*desoxyribo*nucleotiden synthetisiert. Es entstehen so zwei identische Doppelketten. Bei der Zellteilung wird auf diese Weise die in den DNS enthaltene genetische Information auf den Chromosomensatz der Tochterzelle übertragen.

Die Information für die Proteinsynthese im Cytoplasma wird durch die Messenger-RNS (m-RNS) übermittelt. Obwohl verschiedene Einzelheiten über die Biosynthese der m-RNS noch unklar sind, wurde folgendes Bild entwickelt (Abb. 20):

Ähnlich wie bei der Replikation von DNS wird an jeder der beiden Desoxyribonucleotidketten der DNS eine Komplementkette – diesmal aus Mono*ribo*nucleotiden – gebildet. Die beiden neuen Moleküle sind Hybrid-

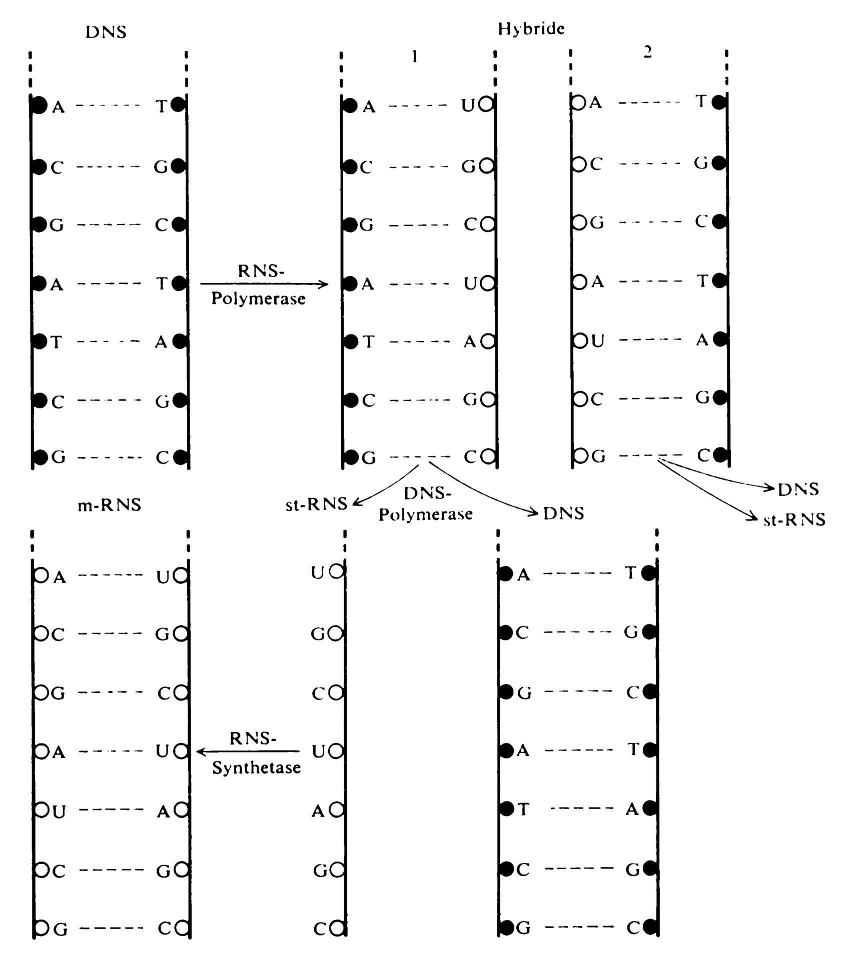


Abb. 20. Biosynthese der Messenger-Ribonucleinsäure (m-RNS).
Kreise: Ribose, gefüllte Kreise: Desoxyribose, st-RNS = Stencil-RNS.

ketten mit je einem Polyribonucleotid und einem Polydesoxyribonucleotid. Schließlich werden die Hybride durch Bildung komplementärer Polydesoxyribonucleotide wieder gespalten, und es entsteht der ursprünglichen DNS identische DNS und aus nur einer Kette bestehende sogenannte «Stencil-RNS» (st-RNS). Diese st-RNS ist die Schablone für die Bildung der m-RNS, ein Vorgang, der sich höchstwahrscheinlich im Nucleus abspielt. Im Endresultat ist also aus einer DNS eine RNS mit identischer Sequenz der Basen gebildet worden, wobei in den RNS Uridin anstelle von Thymin gefunden wird. m-RNS wird an das Cytoplasma abgegeben und an Ribosome, den eigentlichen Ort der Proteinsynthese, gebunden.

An der Proteinsynthese ist noch ein weiterer Nucleinsäuretyp, die «transfer»-RNS oder «soluble»-RNS (s-RNS) beteiligt. s-RNS-Moleküle haben eine strukturelle Besonderheit, sie bestehen nicht aus zwei komplementären Ketten, sondern aus einer einzelnen Kette, die wie eine Haarnadel gebogen ist. In den beiden Schenkeln liegen sich, durch Wasserstoffbrücken verbunden, wiederum die komplementären Basen gegenüber. Außerdem haben die Moleküle noch «freie» Basen.

Aminosäuren werden nur in Gegenwart von ATP und s-RNS in Proteine eingebaut. Sie reagieren zunächst mit ATP zur Bildung der sogenannten «aktivierten» Aminosäuren (vgl. Seite 31).

$$\text{ATP} + \text{AS} \xrightarrow{\text{Enzym}} \text{AMP-AS} + \text{PP}$$

Unter Freiwerden von AMP wird dann die Aminosäure auf s-RNS übertragen:

$$\text{AMP-AS} + \text{s-RNS} \xrightarrow{\text{Enzym}} \text{s-RNS-AS} + \text{AMP}$$

Es hat sich herausgestellt, daß für jede Aminosäure eine spezifische s-RNS existiert. Die Verbindung der Aminosäure mit der s-RNS erfolgt an einem in der Nucleotidkette endständigen Adeninmononucleotid.

Der s-RNS-AS-Komplex dient dann zur Proteinsynthese an der m-RNS in den Ribosomen. Die «freien» Basen in den s-RNS sind komplementär zu dem für die entsprechende Aminosäure spezifischen Code (s. Abb. 21), und auf diese Weise findet jede Aminosäure ihren richtigen Platz in der Polypeptidkette. Die Reaktionen bei der Proteinsynthese und ihre Lokalisation in der Zelle sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

DER GENETISCHE CODE

Der genetische Code ist in der Sequenz der vier in den Nucleinsäuren vorkommenden Basen – Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin – festgelegt. (Thymin ist in den RNS durch Uridin ersetzt.) Bei der Proteinsynthese müssen 20 verschiedene Aminosäuren in der richtigen Folge aneinandergereiht werden. Ein «Doublet-Code», bestehend aus jeweils 2 Basen, ergibt nur 16 Möglichkeiten und konnte darum von vorneherein ausgeschlossen werden.

Der «Triplet-Code» hat 64 mögliche Kombinationen. Geniale Versuche, zuerst im Laboratorium von Crick, mit induzierten Genmutationen zeig-

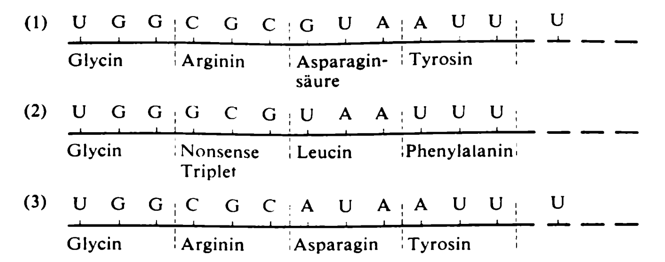


Abb. 21. Der genetische «Triplet-Code».
Erklärung siehe Text.

ten, daß mit einem Triplet-Code viele experimentelle Ergebnisse erklärt werden können. Heute sind die Triplet-Codes für die meisten Aminosäuren bekannt. An einem einfachen, konstruierten Beispiel soll das Arbeiten der Codes demonstriert werden.

Der Anfang der Polypeptidkette eines Enzymproteins soll aus den Aminosäuren Glycin-Arginin-Asparaginsäure-Tyrosin-... bestehen. Wir schreiben den Aminosäuren folgende Triplets zu:

Glycin–UGG
Arginin–CGC
Asparaginsäure–GUA
Tyrosin–AUU

Der Code ist in Abbildung 21 (1) als Teil einer m-RNS dargestellt. m-RNS hat diese Sequenz von DNS übernommen. Nehmen wir nun an, durch eine Genmutation kommt es zum Ausfall einer Base – in unserem Beispiel soll

Tabelle 15. Reaktionen bei der Proteinsynthese und ihre Lokalisation in der Zelle

Lokalisation	Reaktion
Chromosome	DNS + Mononucleotide → DNS + Stencil-RNS
Nukleolus	Stencil-RNS + Mononucleotide → Messenger-RNS
Cytoplasma	Aminosäuren + ATP → Aminoacyl-AMP + PP
Cytoplasma	Aminoacyl-AMP + Transfer-RNS → Aminoacyl-Transfer-RNS + AMP
Ribosome	Messenger-RNS + Ribosome → Aktive Ribosome
Ribosome	Aktive Ribosome + Aminoacyl-Transfer-RNS → *Protein* + Ribosome + Transfer-RNS

es C aus dem Triplet CGC sein –, dann entsteht eine m-RNS mit der Sequenz (2). Wird dieser veränderte Code wiederum in Triplets gelesen, so ist das erste Triplet geblieben, aber alle folgenden sind verändert. Nehmen wir nun weiter an, daß GCG keiner Aminosäure zuzuschreiben ist, so ist ein «Nonsense-Triplet» entstanden. Man hat Grund anzunehmen, daß m-RNS, die ein oder mehrere «Nonsense-Triplets» enthalten, für die Proteinsynthese ausfallen. Denken wir uns nun eine Genmutation, bei der die Base G im Triplet GUA durch A ersetzt ist (3), dann entsteht ein Protein, bei dem an dieser Stelle Asparagin anstatt Asparaginsäure in die Peptidkette eingebaut ist.

Im ersten Fall dieses Beispiels wird die Enzymsynthese ausbleiben. Im zweiten Fall wird das Enzymprotein zwar synthetisiert, aber es hat einen «Webfehler» und ist möglicherweise nicht aktiv – oder es hat eine wesentlich geringere Aktivität als das Enzym mit richtiger Aminosäurenzusammensetzung.

LITERATUR

J. M. Clark, Jr.: Enzymatic steps in protein biosynthesis. In: Proceedings of Symposium on Protein Nutrition and Metabolism. Herausgeber: J. Kastelic, H. H. Draper, H. P. Broquist. Special Publication No. 4. University of Illinois, College of Agriculture. Urbana Illinois, October 1963.

S. Ochoa: Enzymatic mechanism in the transmission of genetic information. In: Horizons in Biochemistry. Herausgeber: M. Kasha und B. Pullmann. Academic Press, New York 1962.

ERBLICHE STOFFWECHSELKRANKHEITEN
(«Inborn errors of metabolism»)

Der Ausdruck «Inborn errors of metabolism» wurde zu Anfang des Jahrhunderts von GARROD geprägt, als er vermutete, daß Enzymdefekte die Ursache erblicher Stoffwechselanomalien seien. In einer Vorlesung über Alkaptonurie führte GARROD aus:

«We may further conceive that the splitting of the benzene ring in normal metabolism is the work of a specific enzyme, that in congenital alkaptonuria this enzyme is wanting while in disease its working may be partially or even completely inhibited.»

Erst Arbeiten mit Genmutationen bei Mikroorganismen, Insekten und schließlich Beobachtungen am Menschen in den letzten beiden Jahrzehnten bestätigten die Gültigkeit der Ideen GARRODS.

Die modernen Anschauungen über die genetische Kontrolle aller Lebensvorgänge gipfeln gegenwärtig in der «Ein Gen – ein Protein»-Theorie oder, für den Spezialfall der Enzymproteine, in der «Ein Gen – ein Enzym»-Theorie (Einzelheiten s. unter Proteinsynthese).

Eine Genmutation führt keineswegs immer zum Ausbleiben der durch das Gen gesteuerten Enzymsynthese. Vielmehr kann ein strukturell ähnliches Protein gebildet werden, das jedoch keine oder verminderte Enzymaktivität besitzt. Die Folgen für den Stoffwechsel sind natürlich die gleichen. Und wenn von einem Enzymdefekt gesprochen wird, dann ist fehlende oder stark verminderte Enzymaktivität gemeint, ohne daß in den meisten Fällen entschieden werden kann, ob die Enzymbildung überhaupt ausbleibt oder ob ein defektes, enzymatisch inaktives Protein gebildet wird.

GLYCOGENSPEICHERKRANKHEITEN

Die erste Beschreibung von Hepatomegalien als Glycogenspeicherkrankheit kam von v. GIERKE im Jahre 1929. Seither sind zahlreiche solche Fälle beschrieben worden, aber erst die biochemische Forschung im letzten Jahrzehnt hat nähere Einblicke in die eigentliche Krankheitsursache gebracht und vor allem aufgezeigt, daß mehrere Typen von pathologischen Glycogenablagerungen existieren. Alle diese Krankheiten haben das Fehlen des einen oder anderen Enzyms der Glycogenolyse zur Ursache.

Glycogen ist ein hochpolymeres Kohlenhydrat (MW 5×10^6 oder ~30000 Glucosereste), aufgebaut aus Glucosemolekülen, die in glucosidischer Bindung miteinander verbunden sind. Glycogen wird hauptsächlich in Leber und Muskel und in geringerem Maße in Niere und Gehirn gespeichert. Glycogen ist ein Energiespeicher, aus dem Glucose zur Verbrennung im Zellstoffwechsel jederzeit zur Verfügung steht.

Die Wege der Glycogenese und der Glycogenolyse sind in Abbildung 22 dargestellt. Glucose wird zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert und dieses zu Glucose-1-phosphat isomerisiert. Glucose-1-phosphat reagiert mit Uridintriphosphat (UTP) zu UDP-glucose, dem eigentlichen Substrat für das polymerisierende Enzym. Zuerst werden Ketten aus Glucosemolekülen gebildet, die in 1.4-glucosidischer Bindung miteinander verbunden sind.

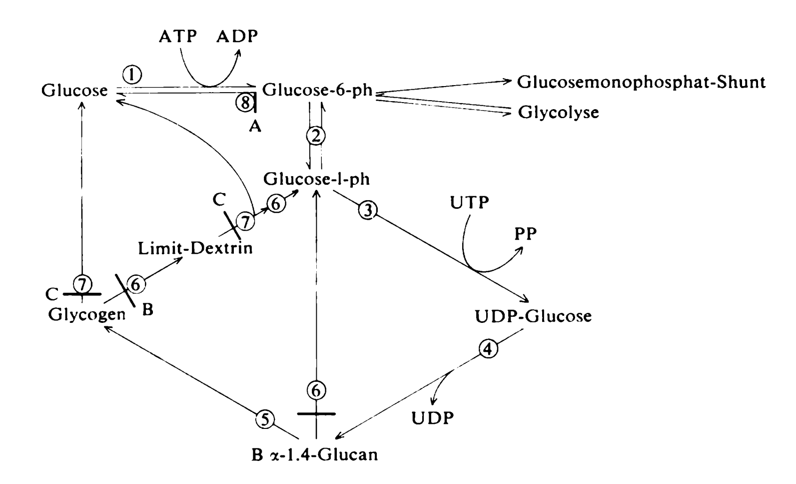


Abb. 22. Glycogenstoffwechsel und seine Störungen.
Stoffwechselblockierungen:
A bei v.-Gierkescher Krankheit, B bei Hersscher Krankheit, C bei Forbescher Krankheit.
Enzymreaktionen (die Nummern entsprechen den Zahlen in den Kreisen in Abb. 22):

1. Glucokinase [2.7.1.2]
   ATP + D-Glucose → ADP + D-Glucose-6-ph
2. Phosphoglucomutase [2.7.5.1]
   D-Glucose-6-ph + D-Glucose-1.6-diph ⇌ D-Glucose-1-ph + D-Glucose-1.6-diph
3. Glucose-1-phosphat-uridyl-transferase [2.7.7.9]
   UTP + D-Glucose-1-ph → UDP-Glucose + PP

(Die HO-Gruppe am C_1 des einen Zuckers reagiert mit der HO-Gruppe an C_4 eines anderen Zuckers usw.) Dann katalysiert ein weiteres Enzym die Verzweigung der Ketten, indem 1.4-Bindungen gespalten und 1.6-Bindungen gebildet werden. So entsteht ein stark verzweigtes Makromolekül, das Glycogen. Ein Ausschnitt ist schematisch in Abbildung 23 dargestellt. Der Abbau von Glycogen zu Glucose ist nicht eine Umkehr der Synthesereaktionen, mit Ausnahme der Glucose-phosphat-isomerase-Reaktion. Es müssen vielmehr drei besondere Enzyme vorhanden sein. Zunächst spaltet α-Glucan-phosphorylase von den Kettenenden her, in Gegenwart von anorganischem Orthophosphat, Glucose als Glucose-1-phosphat ab. Dieser Abbau geht so lange vonstatten, bis eine Verzweigungsstelle erreicht wird, an welcher Glucose in 1.6-Bindung gebunden ist, die von α-Glucan-phosphorylase nicht angegriffen werden kann (Grenzdextrine). Hier wirkt nun die Amylo-1.6-glucosidase und spaltet die einzelnen Glucosemoleküle ab (ausgefüllte Kreise in Abb. 23), und zwar als freie Glucose.

Ist die Verzweigungsstelle damit entfernt, so kann α-Glucan-phosphorylase weiter abbauen. Das entstandene Glucose-1-phosphat wird durch die auch beim Aufbau wirkende Isomerase zu Glucose-6-phosphat isomerisiert, das dann von einer spezifischen Glucose-6-phosphatase zu Orthophosphat und Glucose gespalten wird. Letzteres Enzym wird in Leber, Niere und Gehirn, aber nicht im Muskel gefunden. Im Muskel wird Glucose-6-phosphat vielmehr direkt der Glycolyse oder der Oxydation (Hexose-phosphat-Shunt) unterworfen.

Von-Gierkesche Krankheit

Das zuerst von v. GIERKE beschriebene Krankheitsbild geht mit erheblichen Glycogenspeicherungen, vor allem in der Leber, aber auch in der Niere

---

4. UDP-Glucose-α-glucanglycosyl-transferase (Glycogen-synthetase) [2.4.1.11]
   UDP-Glucose + $(\alpha\text{-}1.4\text{-glucosyl})_n \rightarrow$ UDP + $(\alpha\text{-}1.4\text{-glucosyl})_{n+1}$
5. α-Glucan-branching-glucosyltransferase [2.4.1.18]
   Katalysiert die Verzweigung der Polysaccharidketten durch Spaltung von 1.4-glucosidischen Bindungen und Bildung von 1.6-glucosidischen Bindungen. Siehe hierzu Abb. 23.
6. α-Glucan-phosphorylase [2.4.1.1]
   $(\alpha\text{-}1.4\text{-glucosyl})_n$ + P → $(\alpha\text{-glucosyl})_{n-1}$ + D-Glucose-1-ph
7. Amylo-1.6-glucosidase [3.2.1.9]
   Spaltet endständige Glucosemoleküle aus 1.6-glucosidischer Bindung (Verzweigungsstellen) ab. Es entsteht freie Glucose.
8. Glucose-6-phosphat-phosphatase [3.1.3.9]
   D-Glucose-6-ph → D-Glucose + P

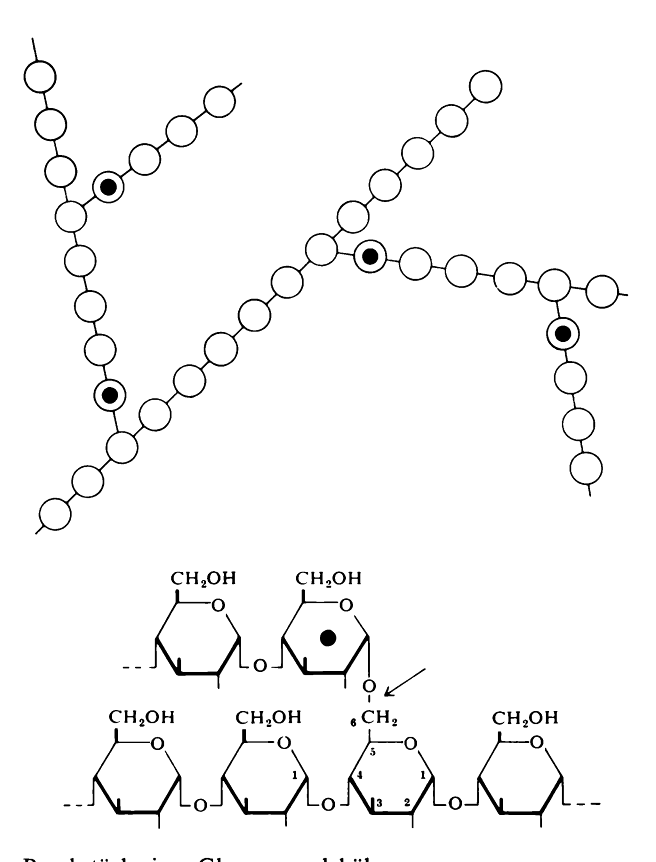


Abb. 23a. Bruchstück eines Glycogenmoleküls.
Die Kreise stellen Glucosemoleküle dar, die in 1.4-glucosidischer Bindung verbunden sind. Die Punkte bezeichnen Glucosemoleküle, die an den Verzweigungsstellen in 1.6-Stellung gebunden sind.

Abb. 23b. Formeldarstellung einer Verzweigungsstelle.
Der Pfeil zeigt auf die Angriffsstelle der Amylo-1.6-glucosidase. Die 1.4-Bindungen werden von der α-Glucan-phosphorylase gespalten.

einher. Wie wir heute wissen, fehlt den Patienten das Enzym Glucose-6-phosphatase oder ist dessen Aktivität stark vermindert. Als Folge des Enzymdefektes kann Glucose-6-phosphat nicht zu Glucose dephosphoryliert werden (s. Abb. 22), und es mangelt an der Bereitstellung entsprechender Glucosemengen zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels, der stark erniedrigt gefunden wird. Geringe Mengen an Glucose werden durch Amylo-1.6-glucosidase gebildet. Die in den Organen gespeicherten Glycogenmoleküle haben normale Struktur.

Der Abbau von Muskelglycogen ist nicht betroffen, da im Muskel gebildetes Glucose-6-phosphat direkt in den intermediären Stoffwechsel einmündet. Im Muskel kommt Glucose-6-phosphatase nicht vor.

Zur Abgrenzung gegen andere Glycogenspeicherkrankheiten kann die Bestimmung von Glucose-6-phosphatase-Aktivität in Lebergewebe (Biopsiematerial) herangezogen werden. Die Aktivität des Enzyms ist entweder nicht nachweisbar oder stark herabgesetzt.

Forbesche Krankheit («limit dextrinosis»)

Im Gegensatz zur v.-Gierkeschen Krankheit wird Glycogen bei dieser Stoffwechselanomalie in Leber, Herz und Skelettmuskel gespeichert. Der Stoffwechseldefekt liegt im Fehlen des Enzyms Amylo-1.6-glucosidase. Als Folge hiervon kann der Abbau von Glycogen nur an den Seitenketten durch α-Glucan-phosphorylase erfolgen. Sobald die Verzweigungsstellen (s. Abb. 23) erreicht sind, kann der Abbau nicht weitergehen. Entsprechend ist auch bei diesen Patienten der Nachschub an Glucose zur Aufrechterhaltung des Blutzuckers vermindert, wenngleich in wesentlich geringerem Maße als bei der v.-Gierkeschen Krankheit. Gluconeogenese aus Protein (glucogene Aminosäuren) trägt zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels bei.

Die molekulare Struktur von Glycogen ist abnormal. Durch den Abbau der Seitenketten kommt es zur Anreicherung sogenannter Grenzdextrine, daher die Krankheitsbezeichnung «limit dextrinosis». Die Bestimmung von Amylo-1.6-glucosidase im Leber- oder Muskelgewebe (Biopsie) ist der einfachste diagnostische Test.

Herssche Krankheit

Bei dieser erst vor wenigen Jahren beschriebenen Erkrankung, die durch stark herabgesetzte Aktivität der α-Glucan-phosphorylase in der Leber ausgezeichnet ist, wird Glycogen in der Leber gespeichert. Es ist bisher nicht entschieden, ob die Bildung von α-Glucan-phosphorylase in der Leber gestört ist oder die Aktivierung des Enzyms aus seiner inaktiven Vorstufe (vgl. Abb. 10, Seite 47). Die Aktivierung der α-Glucan-phosphorylase ist ein enzymatischer Vorgang, und es ist durchaus möglich, daß das spezifische aktivierende Enzym fehlt. Das klinische Bild ist noch nicht näher beschrieben, doch ist anzunehmen, daß es dem der v.-Gierkeschen Erkrankung ähnlich ist. Diagnostisch wird die Bestimmung der α-Glucan-phosphorylase im Lebergewebe (Biopsie) herangezogen. Der Glycogenstoffwechsel im Muskel ist ungestört und die α-Glucan-phosphorylase-Aktivität im Muskel normal. Die Glycogenstruktur ist normal.

McArdle-Schmid-Pearsonsche Erkrankung

Im Gegensatz zur Hersschen Krankheit fehlt α-Glucan-phosphorylase im Muskel, doch ist sie mit normaler Aktivität in der Leber nachweisbar. Entsprechend wird Glycogen nur im Muskel gespeichert. Das Phosphorylase aktivierende Enzym ist mit normaler Aktivität im Muskel vorhanden, so daß es sich sicher um einen Phosphorylasedefekt handelt. Als Folge des Enzymdefektes kann Muskelglycogen nicht abgebaut werden, und es fehlt dem Muskel damit die direkte Energiequelle, was in einer sehr schnellen Muskelermüdung zum Ausdruck kommt. Während beim Gesunden Injektion von Epinephrin zum raschen Anstieg des Blutzuckerspiegels führt (aus Leberglycogen) und Lactat vom Muskel ins Blut abgegeben wird (aus Muskelglycogen via Glycolyse), bleibt bei Patienten mit fehlender Muskelphosphorylase der Anstieg des Blutlactats aus.

Diagnostisch kann weiter die Bestimmung von Phosphorylase im Muskelgewebe (Biopsie) verwendet werden.

Neben den vier beschriebenen Glycogenspeicherkrankheiten gibt es noch einige weniger gut charakterisierte Formen, von denen die eine durch das Fehlen des Enzyms α-Glucosan-branching-glucosyltransferase bestimmt ist.

GALACTOSÄMIE

Die Symptome der Galactosämie zeigen sich schon bald nach der Geburt. Die zunächst normal erscheinenden Babies bekommen nach Milchfütterung schwere Ernährungsstörungen mit Erbrechen und Durchfällen. Die dadurch auftretende Unterernährung beeinträchtigt Wachstum und Entwicklung. Schließlich kommt es zu Leberparenchymschäden (Cirrhosis und Hepatosplenomegalie), und nicht selten sterben die Kinder innerhalb der ersten 8 Lebenswochen. In den wenigen Fällen, die bei unbehandelter Krankheit älter als 8 Wochen werden, stellen sich Katarakte und zentralnervöse Störungen mit geistiger Unterentwicklung ein.

Die der Galactosämie zugrunde liegende Stoffwechselstörung besteht in der Intoleranz von Galactose, einem der beiden Hexosemoleküle des Milchzuckers. Milchzucker wird im Darm zu Glucose und Galactose hydrolysiert, und Galactose wird nach Resorbierung aus dem Darm hauptsächlich in der Leber in Glucose umgewandelt (s. Abb. 24). Bei Galactosämie fehlt das Enzym Hexose-1-phosphat-uridyltransferase. Als Folge davon kommt es zur Akkumulation von Galactose-1-phosphat und Galactose im Organismus mit erhöhtem Blutgalactosespiegel und Galactosurie.

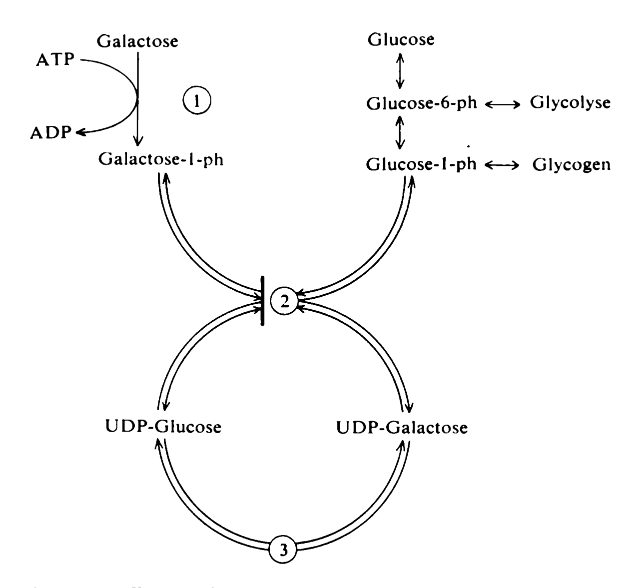


Abb. 24. Galactosestoffwechsel.
Enzymreaktionen:
1. Galactokinase [2.7.1.6]
   ATP + D-Galactose → D-Galactose-1-ph + ADP
2. Hexose-1-phosphat-uridyltransferase [2.7.7.12]
   Galactose-1-ph + UDP-Glucose ⇌ UDP-Galactose + Glucose-1-ph
3. UDP-glucose-epimerase [5.1.3.2]
   UDP-Glucose ⇌ UDP-Galactose (NAD ist Cofactor)

Der Balken bezeichnet den Stoffwechselblock bei Galactosämie.

Auf welche Weise die angereicherten Verbindungen zu Krankheitserscheinungen, insbesondere Schwachsinn, führen, ist gegenwärtig Gegenstand der Untersuchung. Hier sei nur soviel gesagt, daß an die Möglichkeit einer Hemmung anderer Enzymreaktionen, vor allem des Kohlenhydratstoffwechsels, durch Galactose und Galactose-1-phosphat gedacht wird. Dadurch kommt es zur allgemeinen Störung des Zellstoffwechsels.

Die Diagnose der Galactosämie ist nicht schwierig. Unverträglichkeit von Milch bei Neugeborenen sollte sofort den Verdacht auf Galactosämie lenken. Im Urin ist Galactose mit einem spezifischen Galactosetest (Galactose-oxydase) leicht nachweisbar. Das gleiche gilt für den Nachweis von Galactose im Blut. Schließlich kann die Aktivität der Galactose-1-phosphat-uridyltransferase relativ einfach und schnell bestimmt werden. Beim Stoffwechselgesunden kommt das Enzym in den Erythrozyten vor, während es bei Galactosämie nicht nachweisbar ist.

Therapie

Die frühzeitige Erkennung der Galactosämie, möglichst in den ersten Tagen nach der Geburt, ist von allergrößter Bedeutung, da durch eine galactosefreie (milchzuckerfreie) Ernährung, die sehr einfach einzuhalten ist, die völlig symptomfreie und normale Entwicklung der Kinder gewährleistet ist. Selbst Leberparenchymschaden und Katarakt bilden sich zurück. Aber Störungen im Zentralnervensystem mit geistiger Unterentwicklung sind irreparabel. Daher ist die frühzeitige Erkennung der Galactosämie so bedeutungsvoll.

Die diagnostischen Tests sind so einfach, daß sie als Routineuntersuchung bei jedem Neugeborenen durchgeführt werden sollten.

STÖRUNGEN DES FRUCTOSESTOFFWECHSELS

Es sind zwei hereditäre Fructosestoffwechselstörungen bekannt, von denen die eine relativ harmlos ist und außer Fructosurie keine nennenswerten

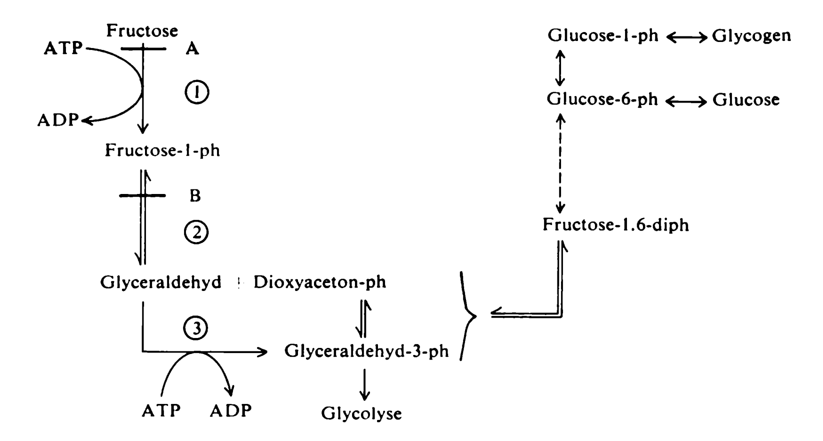


Abb. 25. Fructosestoffwechsel.
Enzymreaktionen:
1. Keto-hexokinase [2.7.1.3]
   ATP + D-Fructose → ADP + Fructose-1-ph
2. Aldolase (1-phosphofructoaldolase) [4.1.2.7]
   Fructose-1-ph ⇌ Glyceraldehyd + Dioxyaceton-ph
3. Glyceraldehyd-kinase [2.7.1.30]
   ATP + Glyceraldehyd → ADP + Glyeraldehyd-3-ph

Für die weiteren Reaktionen s. Glycolyseschema Seite 32.
Stoffwechselblocks: A bei Fructosurie (wahrscheinlich), B bei Fructoseintoleranz

Krankheitserscheinungen zur Folge hat. Der Stoffwechselblock (oder Enzymdefekt) ist noch nicht genug bekannt, aber indirekt läßt sich der Schluß ziehen, daß die Fructokineasereaktion (Ketohexokinase) gestört ist. Im Gegensatz dazu wird bei der sogenannten Fructoseintoleranz die Störung bei der Spaltung der Fructose-1-phosphorsäure durch Aldolase gefunden (s. Abb. 25). Durch die Blockierung des Fructoseabbaus an dieser Stelle kommt es zur Akkumulierung von Fructose-1-phosphat, das im Gegensatz zur nicht phosphorylierten Fructose toxisch wirkt, ganz ähnlich wie Galactose-1-phosphat bei der Galactosämie.

Die Fructoseintoleranz wird beim Säugling festgestellt, wenn seiner Nahrung zum ersten Male Saccharose als Zucker beigefügt wird. Saccharose ist aus einem Molekül Glucose und einem Molekül Fructose aufgebaut. Es stellen sich kurze Zeit nach der Fütterung von Saccharose oder Fructose schwere Krankheitserscheinungen mit Zittern, Erbrechen, Bewußtseinsstörungen und tiefem Koma ein. Das Bild ist dem des hypoglycämischen Komas sehr ähnlich, und tatsächlich kommt es unter Fructosezufuhr zu einem rapiden Absinken des Blutzuckers.

Je frühzeitiger beim Säugling die Diagnose gestellt wird, um so geringer ist die Gefahr einer Hirnschädigung durch Hypoglycämie. Die Prognose ist gut, wenn Fructose und damit Rohrzucker (und Rübenzucker) aus der Diät fortgelassen werden.

INTESTINALE DISACCHARIDASE-INSUFFIZIENZ

Mit der Nahrung zugeführte Disaccharide – Lactose (Galactose-Glucose), Saccharose (Glucose-Fructose) und Maltose (Glucose-Glucose, entsteht im Darm aus Glycogen und Stärke) – werden von spezifischen Disaccharidasen in Monosaccharide gespalten und als solche resorbiert (s. Abb. 26). Bei Insuffizienz dieser Enzyme bleiben die Substrate im Darm liegen und werden von Dünndarmbakterien vergoren. Als Folge treten heftige Gärungsdyspepsien auf, die beim Säugling zu schweren Ernährungsstörungen und, wenn die Ursache als solche nicht erkannt wird, auch zum Tode führen können. Die sogenannte Saccharoseintoleranz ist durch das Fehlen des Enzyms Saccharase verursacht. Die Verdauungsstörungen treten erstmals auf, wenn beim Säugling von Muttermilch auf künstliche Nahrung übergegangen und Saccharose (Rohr- oder Rübenzucker) zum Süßen verwendet wird. Die Lactoseintoleranz hingegen wird mit einsetzender Milchfütterung sofort nach der Geburt manifest. Bei den befallenen Säuglingen fehlt das Enzym Lactase.

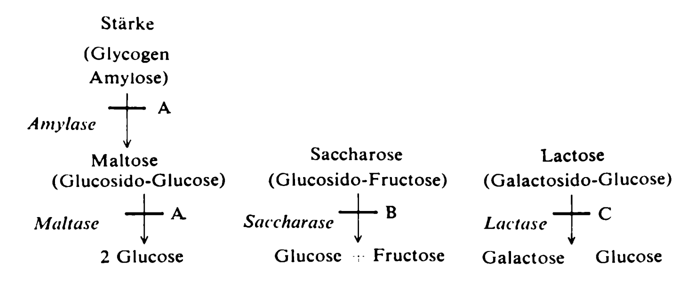


Abb. 26. Aufspaltung von Stärke und Disacchariden im Magendarmkanal. Fehlen der Enzyme: A bei Zöliakie und Stärkeintoleranz (Enzymdefekt noch nicht sicher nachgewiesen), B bei Saccharoseintoleranz, C bei Lactoseintoleranz.

Eine Maltaseinsuffizienz ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es ist aber durchaus möglich, daß die Zöliakie und die Stärkeintoleranz durch Defekte der stärke- und maltoseabbauenden Enzyme verursacht sind.

Die Therapie besteht im Ersatz der Di- und Polysaccharide durch Monosaccharide, die ohne Schwierigkeiten resorbiert werden und Gärungsdyspepsien sofort stoppen. Interessanterweise vermindert sich die Disaccharidintoleranz bei älter werdenden Patienten. Ob solche Spontanheilungen oder wenigstens Besserungen auf eine verspätet einsetzende Bildung der Enzyme oder die adaptive Bildung von disaccharidspaltenden Enzymen zurückzuführen ist, bleibt noch unentschieden.

Diagnostisch wird Belastung mit Disacchariden herangezogen. Bei Disaccharidinsuffizienz wird das betreffende Disaccharid nicht gespalten, und der beim Gesunden erfolgende Anstieg des Blutzuckers bleibt aus.

PHENYLKETONURIE [FÖLLINGSCHE KRANKHEIT]

Die mit hochgradigem Schwachsinn und mannigfaltigen neurologischen Symptomen einhergehende Phenylketonurie hat ihre Ursache im Ausbleiben der Bildung des Enzyms Phenylalanin-4-hydroxylase in der Leber. Dieses Enzym wird normalerweise im Laufe der biochemischen Differenzierung der Leber in den ersten Tagen nach der Geburt gebildet. Phenylalanin-4-hydroxylase oxydiert Phenylalanin zu Tyrosin, das dann weiter zu Acetessigsäure und Fumarsäure abgebaut wird und außerdem als Muttersubstanz für Melanin, Adrenalin und Adrenochrom dient (s. Abb. 27). Fehlt das das Phenylalanin oxydierende Enzym, so kommt es zur Anreicherung von Phenylalanin im Organismus und zur Bildung von Metaboliten, die sonst nur in sehr geringen Mengen entstehen.

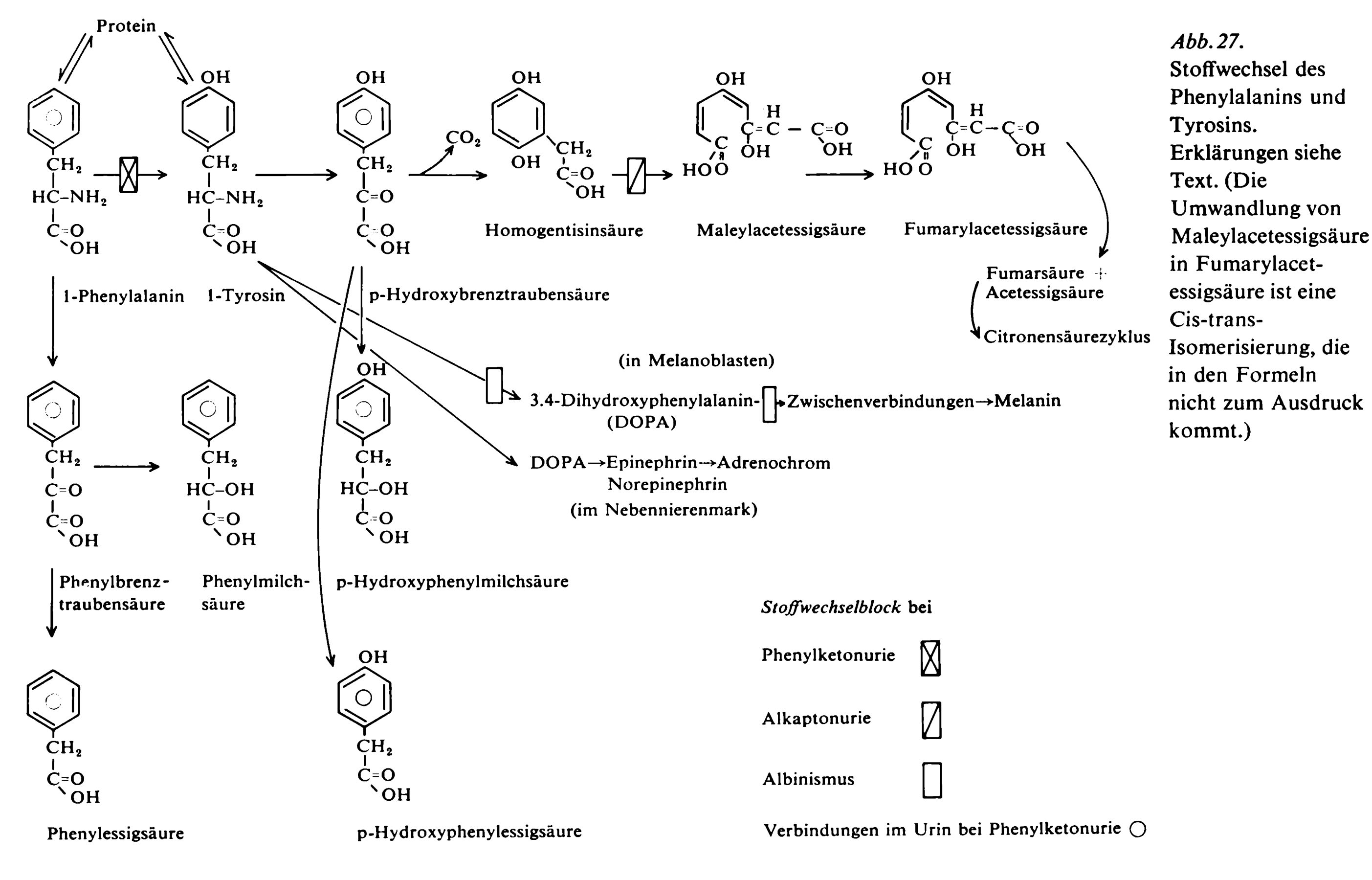


Abb. 27. Stoffwechsel des Phenylalanins und Tyrosins. Erklärungen siehe Text. (Die Umwandlung von Maleylacetessigsäure in Fumarylacetessigsäure ist eine Cis-trans-Isomerisierung, die in den Formeln nicht zum Ausdruck kommt.)

Während die neurologischen Störungen etwa im sechsten Lebensmonat erkennbar werden, sind Phenylalanin und seine Metabolite schon in den ersten Lebenswochen im Serum erhöht und werden im Urin ausgeschieden. Das voll ausgebildete Krankheitsbild ist durch folgende Symptome gekennzeichnet: fortschreitender Schwachsinn mit oft tiefgreifenden morphologischen Veränderungen im Gehirn, Epilepsie, muskuläre Hypertonie, Hyperkinese, Tremor und andere neurologische Symptome. Ferner werden Pigmentationsstörungen an Haut, Haaren und Augen beobachtet. Ekzeme sind nicht selten.

Im Blutplasma steigt Phenylalanin bis auf das Zwanzigfache der normalen Konzentration (normal 0,040–0,100 μMol/ml) an, und entsprechend wird mehr Phenylalanin im Harn ausgeschieden. Phenylbrenztraubensäure, die normalerweise im Plasma nicht nachweisbar ist, wird in Konzentrationen über 0,1 μMol/ml gefunden. Im Urin werden 2 g und mehr Phenylbrenztraubensäure pro Tag ausgeschieden. Daneben werden im Urin Phenylmilchsäure (1 g pro Tag) und geringe Mengen von Phenylessigsäure und p-Hydroxybrenztraubensäure, p-Hydroxymilchsäure und p-Hydroxyessigsäure gefunden.

Es ist beim Blick auf Abbildung 27 ohne weiteres zu verstehen, warum Phenylalanin und seine Metaboliten beim Fehlen des hydroxylierenden Enzyms vermehrt im Organismus und im Urin gefunden werden. Hinsichtlich der Bildung entsprechender Verbindungen der p-Hydroxyphenylreihe (p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, -milchsäure und -essigsäure), die ebenfalls vermehrt gebildet und ausgeschieden werden – wenngleich in wesentlich geringeren Mengen als die Metaboliten des Phenylalanins –, bestehen noch Zweifel. Vielleicht handelt es sich um eine Hemmung der Enzymreaktionen im normalen Tyrosinabbau durch Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure usw.

Es liegen experimentelle Hinweise vor, daß Phenylalanin das Tyrosinasesystem hemmt, womit die Störungen in der Pigmentation durch verminderte Melaninbildung eine Erklärung finden. Einige Patienten mit Phenylketonurie zeigen Veränderungen des Plasmaproteinbildes mit einer abnorm hohen β-Globulinfraktion. Man denkt an die Möglichkeit, daß die hohe Phenylalaninkonzentration im Organismus für die Bildung pathologischer β-Globuline verantwortlich ist.

Therapie

Die Phenylketonurie ist ein gutes Beispiel für die tiefgreifenden Folgen einer Stoffwechselstörung, die durch das Fehlen eines einzigen Enzyms

hervorgerufen wird. Phenylalanin ist wie Tyrosin eine essentielle Aminosäure und wird mit dem Nahrungseiweiß aufgenommen. Phenylalanin und Tyrosin haben einen gemeinsamen intermediären Stoffwechsel, in welchem ersteres in Tyrosin umgewandelt wird. Bleibt dieser Schritt aus, dann wird Phenylalanin im Organismus angereichert und der Abbau in eine andere Bahn gelenkt. Es sind die Aminosäure und ihre pathologischen Metaboliten, die das Zellmilieu so weitgehend verändern, daß das symptomenreiche, schwere Krankheitsbild der Phenylketonurie entsteht.

Hieraus ergeben sich sinnvolle, aber leider praktisch schwer durchführbare Möglichkeiten für eine Therapie. Wird das Phenylalanin aus der Nahrung fortgelassen, was derzeit nur möglich ist, wenn Protein in der Nahrung durch ein Aminosäuregemisch ohne Phenylalanin ersetzt wird, so kann der Phenylalaninspiegel im Organismus auf normale Werte gesenkt werden, und es verschwinden die pathologischen Metaboliten. Soweit tiefgreifende morphologische Veränderungen am Gehirn noch nicht eingetreten waren, verschwinden neurologische Symptome und wird ein Fortschreiten des geistigen Defektes verhindert. Setzt die phenylalaninfreie Diät früh genug ein (in den ersten Lebenswochen), kann eine normale geistige Entwicklung erwartet werden. Die Durchführung einer solchen Diät ist nicht einfach, und es ergeben sich noch andere Ernährungsprobleme.

Phenylalanin ist eine essentielle Aminosäure, das heißt, sie kann im Organismus nicht synthetisiert werden. In gut ausbalancierter Menge muß sie auch den Phenylketonurikern als notwendiger Eiweißbaustein zugeführt werden. Unter balanciert ist hier zu verstehen, daß Mengen aufgenommen werden müssen, bei denen es eben gerade nicht mehr zu pathologischen biochemischen Reaktionen kommt. Kinder benötigen größere Mengen an Phenylalanin als Erwachsene. Freie Aminosäuren werden erfahrungsgemäß im Stoffwechsel schlechter verwertet als Protein. Dies muß berücksichtigt werden bei der Bestimmung der Menge der zuzuführenden Aminosäuren. Schließlich muß für ausreichende Versorgung mit Kalorien durch Kohlenhydrate und Fett gesorgt werden.

ALKAPTONURIE

Alkaptonurie ist eine seltene hereditäre Stoffwechselerkrankung. Die Patienten scheiden im Urin Homogentisinsäure aus, die beim Stehen an der Luft im alkalischen Urin zu einem schwarzgrauen Farbstoff oxydiert wird. Als Komplikationen treten Ochronosis und Arthritis auf. Ursache der

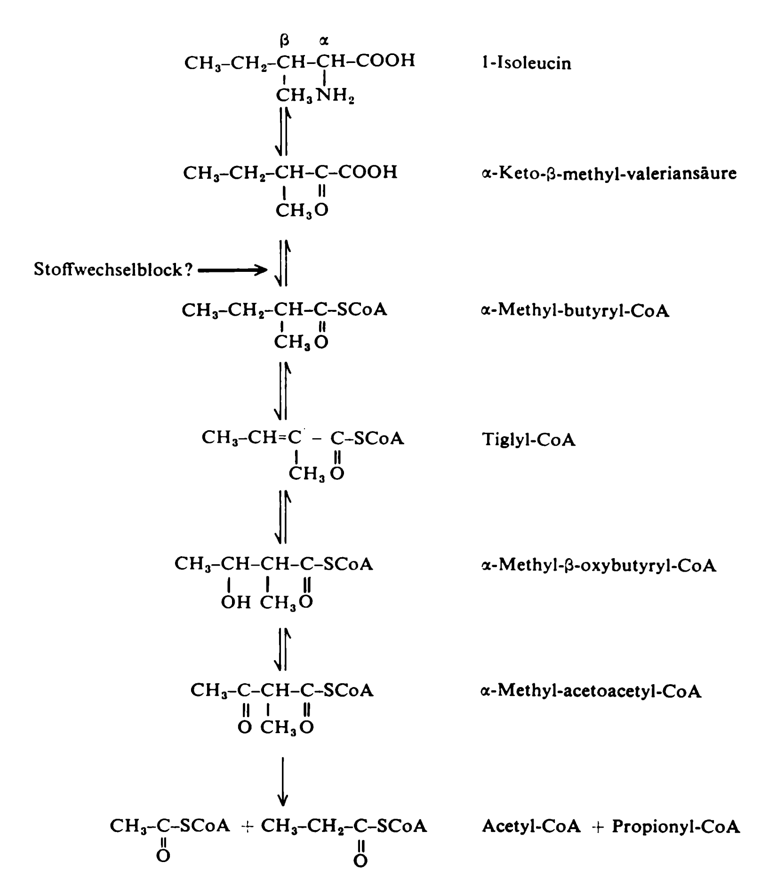


Abb. 28. Stoffwechsel des Isoleucins. Beim «Maple syrup urine disease» kann wahrscheinlich die α-Keto-β-methyl-valeriansäure nicht decarboxyliert werden.

Stoffwechselstörung ist das Fehlen des Enzyms Homogentisat-oxygenase, welches Homogentisinsäure, ein normales Zwischenprodukt beim Abbau von Phenylalanin und Tyrosin, weiter metabolisiert (s. Abb. 27).

ALBINISMUS

Albinos sind durch Fehlen von Pigment in der Haut, den Augen (Iris und Retina) und den Haaren gekennzeichnet und werden bei fast allen Tierspezies beobachtet. Beim Albinismus wird in den pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) das Enzym Tyrosinase nicht synthetisiert, die Zellen als solche sind aber vorhanden. Damit fehlt ein Glied in der Enzymkette, die

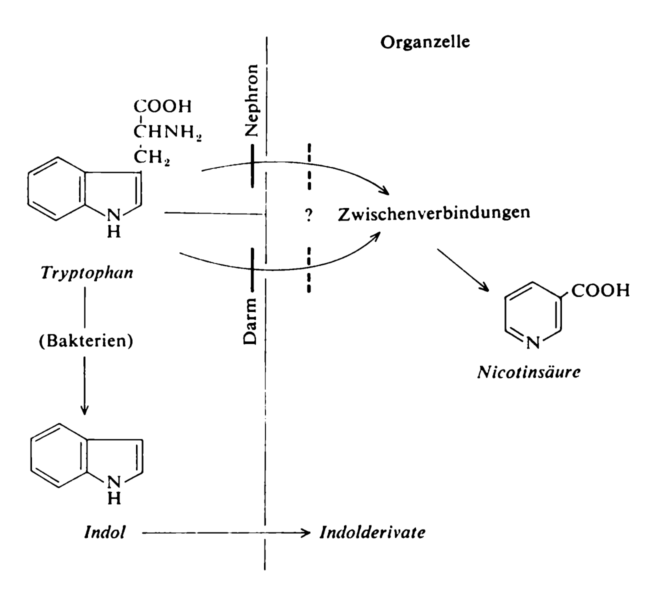


Abb. 29. Resorptionsstörungen des Tryptophans bei «Hartnup disease». Erklärungen siehe Text.

aus Tyrosin und Phenylalanin Melanin bildet, und jegliche Pigmentierung bleibt aus (s. Abb. 27).

Es sind Fälle von begrenztem Albinismus bekannt, bei denen der Pigmentmangel auf Augen oder Haare beschränkt ist. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß die Biosynthese von Epinephrin und Adrenochromen, die im Nebennierenmark erfolgt und die ebenfalls über Dihydroxyphenylalanin verläuft, nicht gestört ist.

«MAPLE SYRUP URINE DISEASE»

Einige wenige Fälle dieser Krankheit sind bisher in der Literatur beschrieben worden. Es handelt sich um Kleinkinder, die nicht älter als 2 Jahre geworden sind und folgende Symptome zeigten: Erbrechen, schlechte Nahrungsaufnahme, Hypertonie der Muskulatur, Intelligenzstörungen. Der Urin hat bisweilen (intermittierend) einen Geruch nach Maple-(Ahorn-)Sirup. Im Urin werden vermehrt die Ketosäuren der verzweigten Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin) ausgeschieden. Der Serumspiegel dieser Aminosäuren und von Methionin ist erhöht, der Serumspiegel von Cystin stark erniedrigt. Der normale Abbau von verzweigten Aminosäuren ist am Beispiel von Isoleucin in Abbildung 28 skizziert. Ob-

wohl der eigentliche Block im Stoffwechsel noch nicht aufgeklärt ist, wird angenommen, daß der Enzymdefekt distal von den entsprechenden Ketosäuren zu suchen ist. Der erhöhte Methioninspiegel und der verminderte Gehalt des Serums an Cystin lassen eine Störung im Methioninstoffwechsel vermuten.

«HARTNUP DISEASE»

Beim «Hartnup disease» liegt eine Resorbierungsstörung mehrerer Aminosäuren im Dünndarm und im Nephron vor. Die Resorbierungsstörung im Nephron führt zu vermehrter Ausscheidung von Alanin, Serin, Threonin, Asparaginsäure, Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan und Histidin.

Im Urin werden vermehrt Indole ausgeschieden. Diese entstehen durch bakterielle Zersetzung von Tryptophan im Dickdarm. Durch die gestörte Resorbierung von Nahrungsaminosäuren im Jejunum erreichen größere Mengen Tryptophan den Dickdarm und werden bakteriell zersetzt. In einigen Fällen wurden bis zu 30% des aufgenommenen Tryptophans als Indolderivate im Harn ausgeschieden.

Das Krankheitsbild dieser Stoffwechselstörung hat Ähnlichkeit mit der Pellagra (Nicotinamidhypovitaminose). Normalerweise wird ein Teil des Nicotinamids endogen aus Tryptophan gebildet. Bei «Hartnup disease» wird nicht genügend Tryptophan resorbiert, um die ausreichende Biosynthese von Nicotinamid zu erlauben (Abb. 29).

LOWE-SYNDROM

Das Lowe-Syndrom ist durch Schwachsinn, mannigfache neurologische Symptome, Katarakt, Glaukom und renale tubuläre Azidose gekennzeichnet. Im Urin werden eine Reihe Aminosäuren, darunter Glutamin, vermehrt ausgeschieden. Das pH des Urins sinkt selbst unter Ammoniumchloridbelastung nicht unter 6. Ferner besteht leichte Proteinurie.

Im Laboratorium des Verfassers wurden die quantitativen Enzymverteilungsmuster in den Nieren zweier Brüder im Alter von 2 und 6 Jahren mit Lowe-Syndrom untersucht. Aus Biopsiegewebe wurden mit der auf Seite 61 beschriebenen Technik die verschiedenen anatomischen und funktionellen Einheiten des Nephrons präpariert und quantitativ auf folgende Enzyme untersucht: LDH, MDH, GDH, AspAT, AlAT, CA und Glutaminasen. Bis auf eine gesteigerte LDH-Aktivität in den proximalen und distalen Konvoluten, die möglicherweise altersbedingt ist, wurden

normale Enzymverteilungsmuster gefunden. Weder die gesteigerte Ausscheidung von Glutamin noch die gestörte Ausscheidung an titrierbarer Säure konnte auf Enzymdefekte zurückgeführt werden.

Wo der Stoffwechselblock zu suchen ist, ist noch unbekannt. Die Therapie ist rein symptomatisch.

CYSTINURIE

Bei anscheinend normalem intermediärem Stoffwechsel der Aminosäuren werden erhebliche Mengen von Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin im Harn ausgeschieden. Der Defekt liegt in einer gestörten Rückresorbierung dieser Aminosäuren aus dem Glomerulumfiltrat im Nephron. Einzelheiten über den Transportmechanismus und die daran beteiligten Enzymsysteme sind aber noch nicht aufgeklärt (s. Kapitel Niere). Da Cystin schwer löslich ist, kommt es leicht zur Nierensteinbildung. Die Diagnose der Cystinurie wird häufig erst gestellt, wenn der Urin eines Nierensteinkranken auf Aminosäuren untersucht wird.

CYSTINOSIS [CYSTINSPEICHERKRANKHEIT]

Cystinablagerungen in fast allen Geweben, hochgradige Entwicklungsstörungen, rasch fortschreitende interstitielle Nephritis und Urämie beherrschen das Krankheitsbild der befallenen Kinder, die das Erwachsenenalter nicht erreichen. Im Urin werden fast alle Aminosäuren vermehrt ausgeschieden. Der Enzymdefekt liegt im intermediären Stoffwechsel des Cystins, konnte aber bisher noch nicht lokalisiert werden.

METHÄMOGLOBINÄMIEN

Ein Hämoglobinmolekül (Hb) ist aus einem Molekül Globin (Protein) und 4 Molekülen Häm aufgebaut. Menschliches und tierisches Hämoglobin ist heterogen, das heißt, es existieren mehrere Hb-Arten, die sich im Proteinanteil voneinander unterscheiden. In den letzten beiden Jahrzehnten sind eine Reihe von pathologischen Hb-Formen entdeckt worden, zum Beispiel bei der Sichelzellenanämie, Thalassämie, Methämoglobinämie und anderen.

Die Bildung von pathologischem Hb hat ihre Ursache in genetisch bedingten Defekten in den an der Globinsynthese beteiligten Enzymsystemen. Hierdurch entstehen «Webfehler» in der Proteinstruktur.

Zu wenig ist bisher über die Einzelheiten der Enzymdefekte bekannt, als daß es gerechtfertigt wäre, im Rahmen dieser Abhandlung darauf einzugehen. Es soll nur ein Beispiel gegeben werden, und zwar die Methämoglobinämie mit Hämoglobinanomalie, weil dieser Erkrankung eine andere Methämoglobinämie mit einem sicher nachgewiesenen Enzymmangel in den Erythrozyten gegenübergestellt werden kann.

Die Bildung geringer Mengen Methämoglobin (Fe^{+++}), die 1% des Gesamt-Hb nicht überschreiten, ist physiologisch. In den Erythrozyten kann ein Enzym nachgewiesen werden, das Methämoglobin zu Hb reduziert ($Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++}$) und dafür sorgt, daß keine größeren Mengen an MetHb angereichert werden. Bei der Methämoglobinämie infolge Hb-Anomalie wird ein pathologisches Hb gefunden, das leichter zu Methämoglobin oxydiert wird oder schwerer durch die MetHb-reduktase reduziert wird. Bis zu 30% Methämoglobin wird bei diesen Patienten gefunden. Im Gegensatz hierzu haben Patienten mit enzymopenischer Methämoglobinämie stark erniedrigte MetHb-reduktase-Aktivität in den Erythrozyten bei normaler Hb-Struktur.

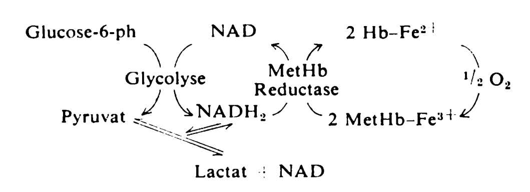


Abb. 30. Enzymatische Reduktion von Methämoglobin. Erklärungen siehe Text.

Die Wirkungsweise der MetHb-reduktase ist in Abbildung 30 dargestellt. Das Enzym ist ein Flavoprotein, dessen Spezifität in bezug auf die Hb-Reduktion noch umstritten ist. Bisher isolierte und gereinigte Enzympräparate haben eine höhere Affinität zu Cytochrom C.

Bei mangelnder MetHb-reduktase-Aktivität wird NAD^{+} in größerem Umfang als normal in der LDH-Reaktion regeneriert. Damit kommt es zu einer beträchtlichen Erhöhung des Lactat/Pyruvat-Quotienten von etwa 15 auf über 200. Patienten mit MetHb sind zyanotisch, und die häufigste Fehldiagnose ist die des angeborenen Herzfehlers.

Therapeutisch kann die Methämoglobinämie durch hohe Dosen Vitamin C gebessert werden. Es wird angenommen, daß Vitamin C zunächst Glutathion reduziert und dieses dann mit MetHb reagiert.

Unter den hereditären Anämien sind Formen bekannt, bei denen Eisen, trotz ausreichenden Angebots, nicht in Hämoglobin eingebaut wird. Der Defekt kann in der Synthese des Porphyrins oder im Einbaumechanismus des Eisens in Protoporphyrin liegen. Die diesen Störungen zugrunde liegenden Enzymanomalien sind noch nicht genau bekannt. Das Krankheitsbild entspricht dem der hypochromen Anämie.

Im Gegensatz dazu kennt man hämolytische Anämien mit genetisch bedingten Veränderungen im Erythrozytenstoffwechsel, die wahrscheinlich auf Defekte einzelner Enzyme zurückzuführen sind.

Bei der Primaquin-sensitiven hämolytischen Anämie (Favismus) ist die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Aktivität in den Erythrozyten stark herabgesetzt oder fehlt vollständig. Hierdurch wird der $NADP/NADPH_2$-Quotient zugunsten des NADP verschoben. Gleichzeitig wird auch weniger $NADH_2$ gebildet, obwohl ein direkter Zusammenhang mit der verminderten Glucose-6-phosphat-dehydrogenase nicht besteht. Der Mangel an $NADH_2$ wiederum setzt den Lactat/Pyruvat-Quotienten herab. Der intrazelluläre Stoffwechseldefekt allein führt nicht zu Hämolyse. Diese wird erst ausgelöst, wenn Primaquin oder andere Derivate des 8-Aminochinolins verabreicht werden. In vitro lassen sich mit Primaquin auch in normalen Erythrozyten Stoffwechselveränderungen nachweisen, die jedoch nicht so ausgesprochen sind wie in den enzymopenischen Zellen. Primaquin hemmt von den Dehydrogenasen anscheinend nur die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, die in den enzymopenischen Erythrozyten ohnehin schon sehr wenig aktiv ist. Werden Primaquin und andere oben erwähnte Medikamente von den Patienten vermieden, so tritt Hämolyse im allgemeinen nicht ein.

Besonderheiten der Glycolyse in Erythrozyten

In Erythrozyten verläuft die Glycolyse etwas anders als in den übrigen Körperzellen. Statt der Übertragung des Carboxylphosphatrestes auf ADP ist eine Mutase wirksam, die 1.3-Phosphoglycerinsäure in 2.3-Phosphoglycerinsäure umwandelt. Diese wird dann zu 3-Phosphoglycerinsäure dephosphoryliert, unter Bildung von anorganischem Phosphat (Rapoport-Luebering-Zyklus). Als Erklärung nimmt man an, daß die Bildung von 1 Mol ATP pro Mol Triose vermieden wird (bei der normalen Glycolyse werden 2 Mol ATP gebildet, s. Abb. 31), um keinen Mangel an ADP entstehen zu lassen.

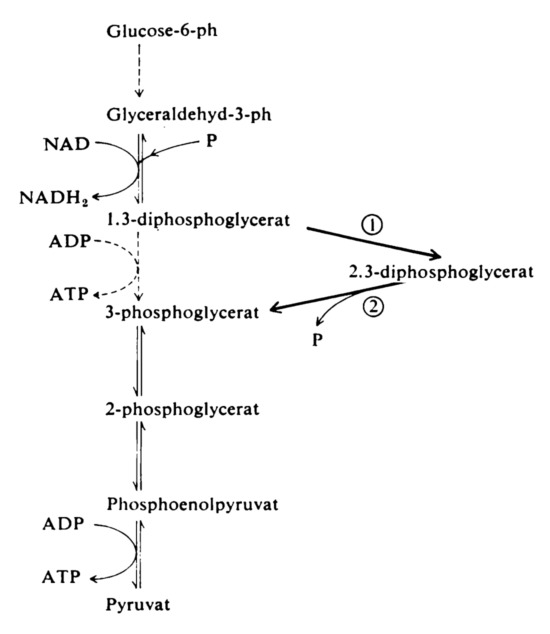


Abb. 31. Besonderheiten der Glycolyse in Erythrozyten (Rapoport-Luebering-Zyklus).

Enzymreaktionen:

1. Diphosphoglyceromutase [2.7.5.4]
   D-1.3-diphosphoglycerat + D-3-phosphoglycerat → D-2.3-diphosphoglycerat + D-3-phosphoglycerat
2. Diphosphoglycerat-phosphatase [3.1.3.13]
   D-2.3-diphosphoglycerat + H_2O → D-3-phosphoglycerat + P

Für alle anderen Enzyme siehe Glycolyseschema Seite 32, Abb. 2.

Die spezialisierte Entwicklung der Erythrozyten hat zur Beschränkung auf die Glycolyse bei weitgehender Verkümmerung aller anderen Stoffwechselprozesse geführt. Damit sind die ATP-verbrauchenden (oder ADP-regenerierenden) Reaktionen nur mehr in Spuren vorhanden, und es ergibt sich die Notwendigkeit, den Ablauf der Glycolyse, der bei Mangel an ADP zum Stillstand kommt, durch verminderte ATP-Synthese in Gang zu halten (Rapoport).

Es sind einige Fälle von nicht sphärozytären Anämien beschrieben worden, bei denen die Diphosphoglyceromutase-Aktivität vermindert ist. Hierdurch kommt es zur Verlangsamung der Glycolyse, verminderter Bildung von $NADH_2$ und Methämoglobinbildung, da $NADH_2$ nicht in ausreichender Menge zur Reduktion von MetHb zur Verfügung steht (vgl. Methämoglobinämien).

Dieses Krankheitsbild hat seinen Namen von der stark herabgesetzten bis fehlenden Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blutserum, in den Leukozyten und in allen Geweben, einschließlich der Knochen, erhalten. Im Vordergrund der Erkrankung stehen Knochenveränderungen, die der Rachitis sehr ähnlich sind und die in einer abnormen Mineralisation, überschüssigen Bildung von osteoider Grundsubstanz (Knochenmatrix) und irregulärer, endochondraler Verknöcherung bestehen. Die Schwere des Krankheitsbildes variiert beträchtlich. Da die Störung intrauterin manifest sein kann, kommt es zu Totgeburten, andere Kinder sterben in den ersten Lebensjahren. Bei milderen Verlaufsformen wird das Erwachsenenalter erreicht, aber es bestehen Skelettdeformitäten und starke Brüchigkeit. Häufig wird Hypercalcämie (12 mg% und mehr) im Blutserum und Nephrocalcinose gefunden.

Die Rolle, welche die alkalische Phosphatase bei der Knochenmineralisation spielt, ist noch unklar. Es wurden eine Reihe von Hypothesen aufgestellt. Die Mineralisation ist die Einlagerung von anorganischen Ca-Phosphatsalzen in eine organische Substanz, welche von den Osteoblasten gebildet wird. Es wird die Möglichkeit diskutiert, daß die Phosphatase bei der Bildung der organischen Grundsubstanz eine Rolle spielt, andererseits gibt es experimentelle Hinweise, daß die Phosphatase in den Ablagerungsprozeß von Ca-Phosphat eingreift oder daß sie auch auf die Mineralisation hemmend wirkende Phosphorsäureester hydrolysiert.

Bei der Hypophosphatasie wird Äthanolaminphosphat im Urin ausgeschieden. Die Rolle dieser Substanz im Stoffwechsel ist noch unbekannt. Einige Autoren vermuten, daß Äthanolaminphosphat das spezifische Substrat der alkalischen Phosphatase bei der Knochenmineralisation ist. Fehlt das Enzym oder ist seine Aktivität stark herabgesetzt, dann wird überschüssiges Äthanolaminphosphat im Harn ausgeschieden.

Eine Therapie gibt es nicht. Vitamin D ist kontraindiziert.

PATHOLOGIE DER STEROIDHORMON-SYNTHESE

Stoffwechselwirkungen der Nebennierenrinden-(NNR-)Hormone

NNR-Hormone greifen steuernd in den Mineral- und Wasserhaushalt und in den Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide ein. Von den zahlreichen aus NNR isolierten Steroiden haben nur einige wenige Hormonaktivität. Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden, die Mineralcorticoide und die Glucocorticoide.

Steroid Nucleus

Cholesterol

Pregnenolon

Dehydroepi-
androsteron

a

Progesteron

17β-Hydroxy-
progesteron

Androgene → Östrogene

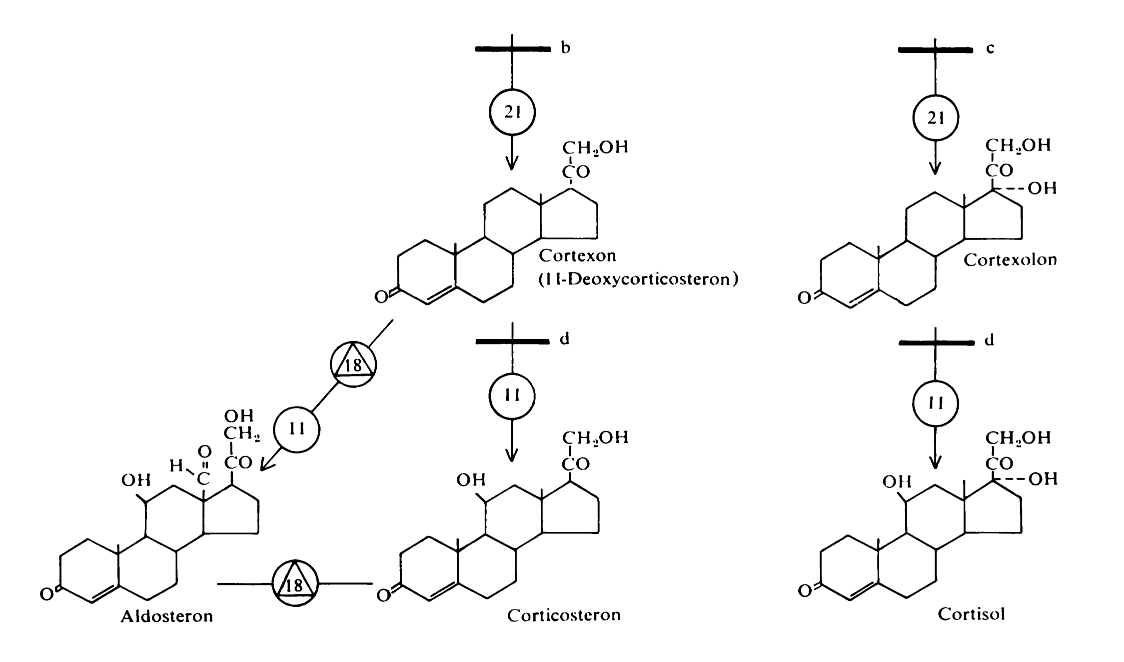


Abb. 32. Biosynthese der Steroidhormone.
Enzymdefekte bei adrenogenitalem Syndrom (AGS): a) AGS mit vermehrter Dehydroepiandrosteron-Bildung, b) AGS mit Salzverlust, c) AGS ohne Salzverlust, d) AGS mit Bluthochdruck

Die Mineralcorticoide (Aldosteron, Cortexon und Cortexolon) greifen wahrscheinlich am Tubulusepithel im Nephron an und regulieren die Rückresorbierung von Na, Cl und Wasser aus dem Glomerulusfiltrat. Bei NNR-Hormonmangel ist die Rückresorbierung gestört, und es kommt zu Na-Verarmung und Wasserverlust im Organismus. Kalium wird retiniert (oder vermehrt rückresorbiert?). Gleichzeitig kommt es zu starken Ionenverschiebungen zwischen dem intra- und extrazellulären Raum, mit intrazellulärem K-Anstieg und verminderter extrazellulärer Na-Konzentration. Infolge der verminderten Na-Rückresorbierung im Nephron, die im Austausch gegen H^+ erfolgt, ist auch die Rückresorbierung von Bicarbonat gestört, und es kommt zur Azidose (vgl. Kapitel Niere). Schließlich stellen sich infolge des Wasserverlustes verminderte Glomerulusfiltration, Harnstoffretention und Kreislaufversagen ein.

Alle diese Störungen werden durch Mineralcorticoide behoben. Am wirksamsten ist das Aldosteron.

Adrenocorticale Hyperfunktion (z. B. Cushing-Syndrom und Hyperaldosteronismus) hat im wesentlichen gegenteilige Folgen: verminderte Na- und Wasserausscheidung durch gesteigerte Rückresorbierung, dementsprechend vermehrte H^+-Exkretion (erhöhte titrierbare Azidität und NH_3 im Urin) und vermehrte Bicarbonatrückresorbierung mit folgender Alkalose, erhöhte K-Ausscheidung (aus dem intrazellulären Raum mobilisiert), Hypernaträmie, Hypokalämie und Verschiebung von Wasser in den extrazellulären Raum.

Bei Mangel an Glucocorticoiden (Cortisol und Corticosteron) sinkt der Glycogengehalt in der Leber (weniger im Muskel) und stellt sich Hypoglycämie ein. Die Glucoseresorbierung aus dem Dünndarm ist herabgesetzt, die Gluconeogenese vermindert.

Die Störungen sind durch Glucocorticoide zu beheben, wobei Cortisol am wirksamsten ist. Cortisol steigert, in großen Dosen gegeben, die Aktivität der Glucose-6-phosphatase und Fructose-1.6-diphosphatase in der Leber. Die Glucocorticoide haben einen katabolischen Effekt auf den Proteinstoffwechsel und fördern die Gluconeogenese aus Aminosäuren, was eine negative Stickstoffbilanz zur Folge hat.

Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluß der Glucocorticoide auf den Fettstoffwechsel sind sehr widersprechend, was nicht zuletzt damit zusammenhängt, daß die einzelnen für die Versuche verwendeten Tierspezies verschieden reagieren. Cortison vermehrt den Fettgehalt der Leber und auch die Synthese von Fettsäuren und Cholesterol in der isolierten, durchströmten Leber. Im Blutplasma finden sich vermehrt ungesättigte

Fettsäuren. Unter dem Einfluß von Glucocorticoiden wird die Ketogenese bei Diabetikern gesteigert.

Das adrenogenitale Syndrom

In den letzten Jahren ist es gelungen, Störungen in der Steroidsynthese in der NNR als Ursache der familiären NNR-Dysfunktion zu erkennen. Die Biosynthese der NNR-Steroidhormone ist in Abbildung 32 dargestellt. Die einzelnen Schritte werden durch Enzyme katalysiert. Zuerst wird vom Cholesterol (Cholesterin) ein Teil der Seitenkette abgespalten. Die folgenden Reaktionen sind Oxydationen, und zwar Dehydrogenasereaktionen an den C-Atomen 3 und 18 (gekennzeichnet durch △) und Hydroxylasereaktionen an den C-Atomen 11, 17, 18 und 21 (gekennzeichnet durch ○).

Die Hydroxylasereaktionen benötigen $NADPH_2$ als Coenzym (s. Abb. 33). An den Hydroxylasen setzt wahrscheinlich die stimulierende Wirkung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) der Hypophyse an, und zwar indirekt über die Synthese von $NADPH_2$ durch Anregung des Glycogenabbaus in der NNR. Dieser führt zu Glucose-6-phosphat, das im Hexosemonophosphat-Shunt oxydiert wird. Dabei entsteht $NADPH_2$ (s. Abb. 4). Die Hydroxylasen sind spezifisch in bezug auf die Stellung im Steroidnucleus.

Bisher am eingehendsten untersucht sind die Synthesestörungen beim angeborenen adrenogenitalen Syndrom (AGS). Das Krankheitsbild ist sehr vielgestaltig, und unterschiedliche Symptome sind auf verschiedene Lokalisation der Enzymdefekte zurückzuführen.

Der Sitz der Defekte ist im Schema durch Buchstaben gekennzeichnet. Die oberhalb einer Blockierung liegenden Verbindungen häufen sich an, und durch den Rückstau wird einmal die Synthese in Richtung der Androgene verschoben (Entwicklung von Hermaphroditismus bei Mädchen und Prämaturität bei Knaben), und zweitens entstehen vermehrt Metabolite der einzelnen Steroide und werden im Urin ausgeschieden.

Abb. 33. Hydroxylierungsreaktion am Steroidnucleus.
O = O gleich molekularer Sauerstoff. Hydroxylierung von C_{11}.

LITERATUR

A. E. GARROD: Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures). Lancet *2*, 1, 73, 142, 214, 1908.

Biochemical Frontiers in Medicine. Herausgeber: H. BUSCH. Little, Brown and Company, Boston 1963.

Erbliche Stoffwechselkrankheiten. Herausgeber: F. LINNEWEH. Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1962.

The Metabolic Basis of Inherited Disease. Herausgeber: J. B. STANBURY, J. B. WYNGAARDEN und D. S. FREDRICKSON. McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, London 1960.

Im Blutplasma (-serum) kann eine ganze Reihe von Enzymen nachgewiesen werden. Nur wenige dieser Enzyme haben im Plasma oder Serum eine Funktion zu erfüllen (plasmaspezifische Enzyme: Ceruloplasmin, Pseudocholinesterase, Lipoproteinlipase, Plasmin, Thrombin), die anderen sind Zellenzyme, die physiologischerweise nur in geringer Menge in die extrazelluläre Flüssigkeit übertreten und ins Blut gelangen. Die Bildung der plasmaspezifischen Enzyme erfolgt hauptsächlich in der Leber, und sie werden aktiv in den extrazellulären Raum abgegeben. Es ist charakteristisch für diese Enzyme, daß ihre Aktivität im Plasma bei Lebererkrankungen – als Ausdruck einer verminderten Synthese – absinkt.

Von der aktiven Sekretion bestimmter Proteine abgesehen, ist die Zellmembran für Proteine nicht durchlässig. Warum werden dennoch zelleigene Enzyme im Blutplasma gefunden? Hier wirken mehrere Faktoren zusammen. Bei der physiologischen Zellmauserung werden laufend Zellenzyme freigesetzt. Ferner ist die Impermeabilität der Zellmembran für Proteine nicht absolut. Die Zellmembran ist eine lebendige Struktur mit spezifischen Funktionen, zu deren Aufrechterhaltung von der Zelle Energie aufgewendet werden muß. Veränderungen im Energiestoffwechsel führen zu Änderungen in der Permeabilität.

Zwischen dem intrazellulären Raum und dem Plasma besteht für alle zelleigenen Enzyme ein sehr hoher Konzentrationsgradient, demzufolge Enzyme bei erhöhter Durchlässigkeit der Membran passiv in den extrazellulären Raum übertreten können. Wie groß der Anteil der physiologisch im Plasma vorkommenden Enzyme aus der Zellmauserung ist und welcher Anteil aus der passiven Permeation stammt, kann heute noch nicht beantwortet werden.

Ins Plasma gelangte Zellenzyme werden mehr oder weniger rasch eliminiert. Ausscheidung durch die Nieren oder mit der Galle (mit Ausnahme der mit der Galle ausgeschiedenen alkalischen Phosphatase) wurde experimentell ausgeschlossen. Wo und wie der physiologische Abbau der Enzymproteine oder die Inaktivierung erfolgt, ist unbestimmt. Gewiß ist nur, daß der Plasmaspiegel der Enzyme aus dem Gleichgewicht zwischen Zufluß und Eliminierung (Inaktivierung oder/und Abbau) erfolgt. Die Halbwertzeiten für einige Enzyme im Plasma sind folgende: GOT 50–60 Stunden, GPT 75–90 Stunden, LDH 50–60 Stunden, GDH 80 Stunden.

Tabelle 16. Normalwerte für Enzymaktivitäten im Blutserum

Enzym	mU/ml	Enzym	mU/ml
LDH	95–250	ICDH	0,5– 4
GPT	3– 18	Alk. P-ase	16 –70[1]
GOT	5– 19		21 –80[2]
GDH	<1		8 –21[3]
SDH	<1	Saure P-ase	2 – 5[2]
CK	<1		

Substrate für Phosphatasen:
[1] p-Nitrophenyl-phosphat
[2] Phenyl-phosphat
[3] β-Glycerophosphat

Bisher sind keine pathologischen Zustände bekannt geworden, bei denen es infolge erhöhter Eliminierung der Enzyme aus dem Plasma zum Absinken des Plasmaspiegels kommt. Der vermehrte Zustrom mit erhöhtem Plasmaspiegel wird dagegen bei vielen Organerkrankungen beobachtet und diagnostisch ausgewertet.

ENZYMVERTEILUNGSMUSTER IM PLASMA

Das Blutplasma hat wie jedes Organ oder Gewebe ein charakteristisches Enzymverteilungsmuster (Tab. 16). Treten nun bei der Erkrankung eines bestimmten Organs vermehrt Zellenzyme in den extrazellulären Raum über, so verändert sich das Enzymmuster des Plasmas. Theoretisch sollte das Enzymmuster dem des erkrankten Organs ähnlich werden. Das ist jedoch nur annäherungsweise der Fall, da die Zellenzyme mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch die Zellmembran hindurchtreten. Neben der Molekülgröße der Enzymproteine spielen der Enzymspiegel und die Lokalisation und Bindung der Enzyme in der Zelle eine Rolle. Die Aktivität ausschließlich im Cytoplasma gelöster Enzyme steigt im Plasma stärker und schon bei leichteren Zellschäden an als die Aktivität der in den Mitochondrien lokalisierten Enzyme. Diese treten erst bei schwereren, die Mitochondrien betreffenden Zellschäden über. Eine Mittelstellung nehmen Enzyme ein, die sowohl im Cytoplasma als auch in den Mitochondrien vorkommen.

Ein charakteristisches Beispiel hierfür ist das Verhalten der Aminotransferasen und der GDH bei Leberzellschäden. GPT und GOT treten ins Plasma über, und zwar kann die GPT-Aktivität die der GOT überstei-

gen, obwohl der Aktivitätsquotient GOT/GPT in der Leber 1,6 ist. Während annähernd 90% der GPT-Aktivität in der Leberzelle im Cytoplasma lokalisiert sind, werden 60% der GOT-Aktivität im Cytoplasma und 40% in den Mitochondrien gefunden. Im Blutplasma des Gesunden ist der GOT/GPT-Quotient 1–1,4 (De Ritis-Quotient) und kann bei Leberzellschäden, bedingt durch den stärkeren Anstieg der GPT, unter 1 abfallen. GDH ist im normalen Blutplasma nicht oder nur in sehr geringer Aktivität nachweisbar. Erst bei schwereren Zellschäden tritt dieses Enzym, das in der Zelle ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist, ins Plasma über. Beim Herzmuskelinfarkt steigt von den Aminotransferasen im Plasma nur GOT an, während die Aktivität von GPT im Normalbereich bleibt. Diese Tatsache ist durch den hohen GOT/GPT-Quotienten im Herzmuskel von 18 (also etwa 10mal größer als in der Leber) zu erklären. Auf nähere Einzelheiten und auf andere für die Diagnostik bedeutungsvolle Enzyme wird bei der Besprechung der verschiedenen Erkrankungen eingegangen.

«ORGANSPEZIFISCHE» ENZYME

Die weitaus größere Zahl aller Enzyme kommt, wenn auch mit sehr unterschiedlichen Aktivitäten, in allen Organen und Geweben vor. Nur wenige Enzyme haben in einem bestimmten Organ erheblich höhere Aktivität als in allen übrigen Organen. Vielfach werden solche Enzyme dann als «organspezifisch» angesprochen, obwohl diese Bezeichnung nicht ganz korrekt ist. Von diesen Enzymen haben die Sorbitoldehydrogenase und die Ornithintranscarbamylase der Leber sowie die Creatinphosphokinase des Muskels diagnostische Bedeutung erlangt.

LEBERERKRANKUNGEN UND PLASMAENZYME

Für die Diagnostik von Lebererkrankungen ist eine ganze Batterie von Enzymen im Plasma herangezogen worden: Phosphoglucomutase (PGM), Phosphohexose-isomerase (PHI), Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), Glutamat-dehydrogenase (GDH), Enolase (ENO), Lactat-dehydrogenase (LDH), Alkohol-dehydrogenase (ADH), Transketolase (TK), Isocitrat-dehydrogenase (ICDH), Malat-dehydrogenase (MDH), Sorbitol-dehydrogenase (SDH), Ornithin-transcarbamylase (OCT), Aspartat-amino-transferase (AspAT = GOT), Alanin-amino-transferase (AlAT = GPT), Leucin-aminopeptidase (LAP), alkalische Phosphatase (AP) und einige andere mehr.

Am eingehendsten untersucht und zu praktischer Verwendung gelangt sind die beiden Aminotransferasen, die Glutamat-dehydrogenase, die Lactat-dehydrogenase und die alkalische Phosphatase.

E. und F. W. SCHMIDT haben kürzlich in einer umfangreichen Arbeit ihre Erfahrungen an 1500 Leberkranken mit den fünf letztgenannten Enzymen mitgeteilt. Die folgende Besprechung basiert im wesentlichen auf diesem Bericht.

Akute Hepatitis

Bei der akuten Hepatitis wird oft schon vor dem Auftreten einer Bilirubinämie der Anstieg von Zellenzymen im Plasma gefunden. Der Grad des Anstieges ist annähernd ein Maß für die Schwere der Zellschädigung, aber es besteht keine sichere Beziehung zur Dauer und Ausheilungstendenz der Lebererkrankung. Eine schnell und vollständig ausheilende Hepatitis kann von extrem hohen Enzymaktivitäten im Plasma zu Beginn der Erkrankung begleitet sein, während mäßige Enzymaktivitätsanstiege den Übergang in chronische Stadien nicht ausschließen.

Bei der akuten Hepatitis gehen die in der 1. und 2. Woche stark erhöhten Aminotransferasen (GOT und GPT) im Verlauf von 5–8 Wochen langsam auf Normalwerte zurück. Die Lactat-dehydrogenase zeigt wesentlich geringeren Aktivitätsanstieg im Plasma und fällt im Durchschnitt rascher als die Aminotransferasen wieder ab. Die Glutamat-dehydrogenase ist bei schwereren Verlaufsformen mit wahrscheinlich ausgedehnter Zytolyse für längere Zeit erhöht. Bei der Mehrzahl der Patienten am erwähnten Krankengut sinkt die Aktivität aber nach 5–8 Wochen auf annähernd normale Werte ab.

Bei den akuten Hepatitiden wird meist ein mäßiger Anstieg der alkalischen Phosphatase im Plasma gefunden. Höhere Aktivitäten treten bei Cholestase auf.

E. und F. W. SCHMIDT finden in ihrem Krankengut einen erheblichen Prozentsatz an Patienten, die auf Grund des histologischen Leberbefundes als ausgeheilt anzusehen waren, bei denen jedoch die Zellenzyme im Plasma erhöht blieben. Hier deutet sich also eine Diskrepanz zwischen morphologischem Befund und dem Verhalten der Zellenzyme im Plasma an, und die Autoren vertreten wohl mit Recht den Standpunkt, daß erhöhte Enzymaktivitäten im Plasma bei normalem histologischem Leberbefund als Fortbestehen einer Zellschädigung betrachtet werden müssen.

In den Abbildungen 34–37 sind einige typische Enzymaktivitätskurven bei akuter Hepatitis dargestellt. Das Material wurde von der Leberabteilung (Prof. Dr. KAPPS) des Presbyterian-St. Luke's Hospital, Chicago, zur Ver-

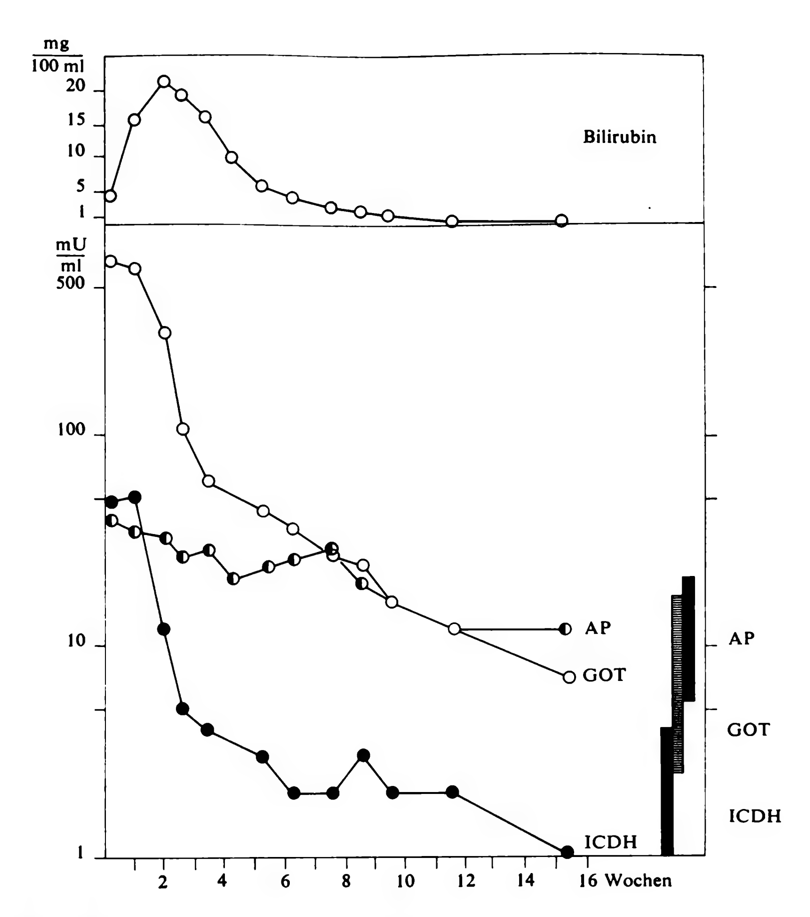


Abb. 34. Serumenzyme bei akuter Hepatitis.
AP = alkalische Phosphatase, GOT = Aspartat-aminotransferase (AspAT), ICDH = Isocitrat-dehydrogenase. Die Balken bezeichnen den Normalbereich. Erklärungen zur Krankengeschichte siehe Text.

fügung gestellt. Regelmäßig werden bei allen Leberkranken GOT, ICDH und alkalische Phosphatase bestimmt. GPT wird nur gelegentlich gemessen.

Die Anamnesen der Patienten (Abb. 34, 35) waren typisch. 1–2 Wochen vor Krankenhausaufnahme setzten Müdigkeit, Appetitlosigkeit, dunkler Urin und acholische Stühle ein. Wenige Tage vor Einweisung trat Ikterus auf. Der Krankheitsverlauf war in allen drei Fällen komplikationslos, wenn auch von verschiedener Dauer. Die Enzymwerte kehrten zum Normalbereich zurück, die Patienten wurden geheilt entlassen. Eine anikterisch und komplikationslos verlaufende Hepatitis ist in Abbildung 36 dargestellt.

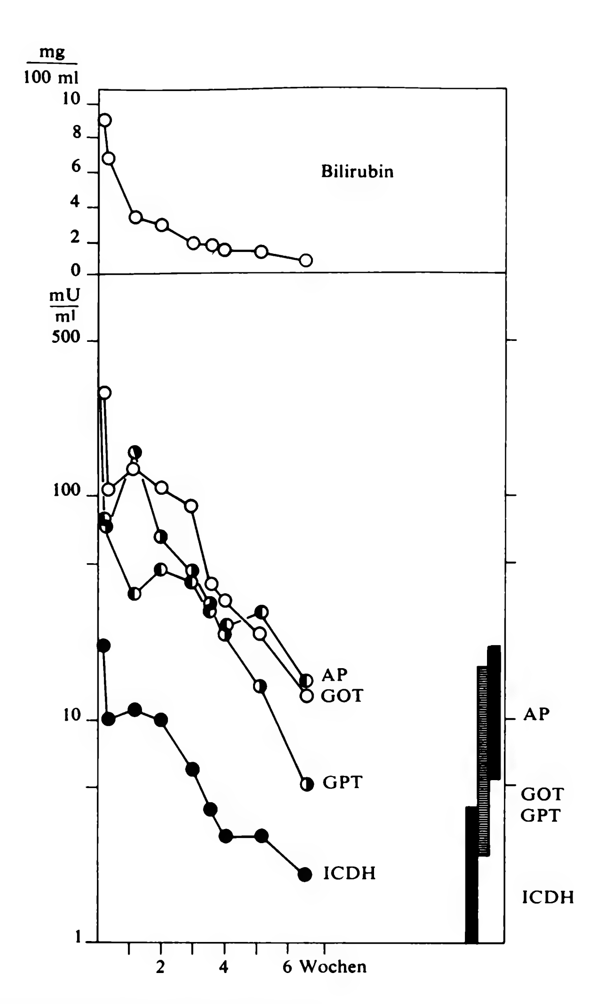


Abb. 35. Serumenzyme bei akuter Hepatitis.
GPT = Alanin-aminotransferase (AlAT). Für die anderen Abkürzungen siehe Abb. 34.

Abbildung 37 zeigt schließlich einen Fall mit auffallenden Schwankungen aller drei bestimmten Enzyme. Nachdem GOT, ICDH und Bilirubin nach 2 Wochen zur Norm zurückgekehrt waren, kam es unter Verschlechterung des klinischen Bildes zu einem erneuten Enzym- und Bilirubinanstieg. Danach setzte rasch subjektive Besserung ein. Nur die stark bis zu pathologischen Werten schwankenden Enzymaktivitäten deuteten auf eine schubweise verlaufende Hepatitis hin. Der Patient steht noch in ambulanter Beobachtung.

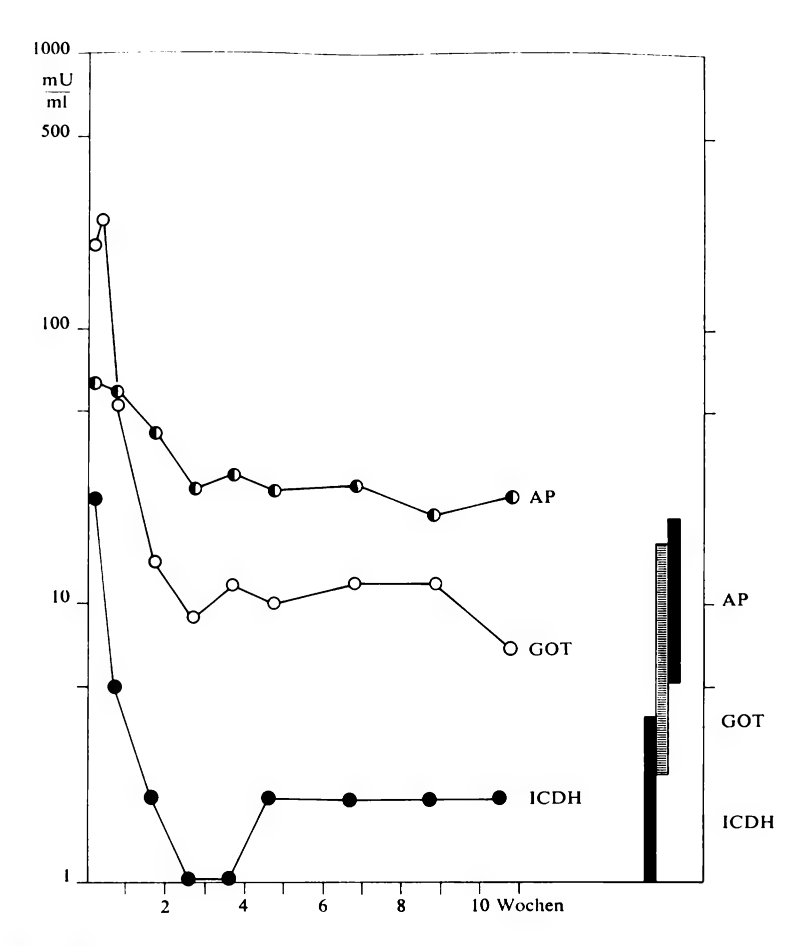


Abb. 36. Serumenzyme bei anikterischer, akuter Hepatitis.
Siehe Legende zu Abb. 34. Die Kinder der Patientin waren an ikterischer Hepatitis erkrankt.

Chronische Hepatitis

Heilt eine Hepatitis nicht aus, sondern geht in ein chronisches Stadium über, dann bleiben die Aktivitäten, besonders jene der Amino-transferasen, als Ausdruck des fortbestehenden Leberparenchymschadens erhöht. Im Krankengut von E. und F. W. Schmidt haben nur 5% aller Patienten mit chronischer Hepatitis normale GOT- und 9% normale GPT-Aktivität im Plasma. Abbildung 38 zeigt die Beobachtungen an einer Patientin mit chronischer Hepatitis in unserem Hospital.

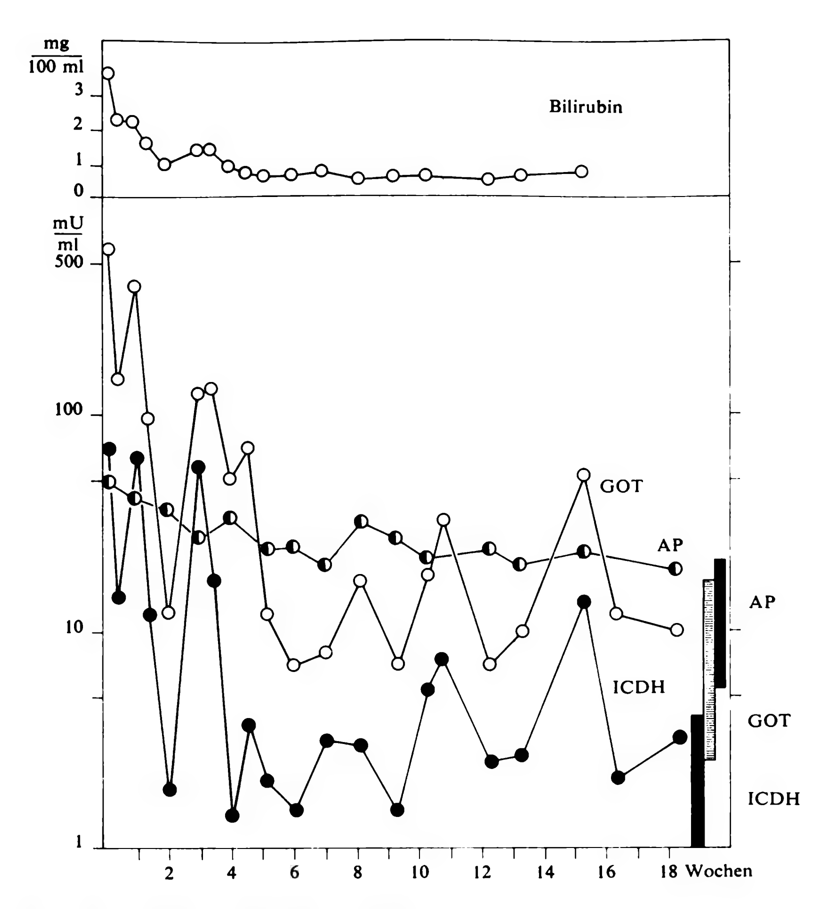


Abb. 37. Serumenzyme bei akuter Hepatitis.
Siehe Legende zu Abb. 34 und Text.

Die damals 15jährige Patientin erkrankte an einer akuten Hepatitis und wurde nach 4wöchiger Behandlung in einem anderen Krankenhaus als geheilt entlassen. Sie befolgte die Anweisung, sich noch für mehrere Wochen zu schonen, nicht und kam 4 Wochen später mit einem erneuten Ikterus in unserem Hospital zur Aufnahme. Das klinische Bild, die Enzymaktivitäten im Plasma und die Serumproteinproben sprachen zunächst für eine akute Hepatitis, doch ging diese im weiteren Verlauf in ein chronisches Stadium über. Eine im 10. Krankheitsmonat durchgeführte Leberbiopsie bestätigte die Diagnose einer chronischen Hepatitis mit beginnender Zirrhose. Die Patientin wurde mit Prednison behandelt. Ob die darauf

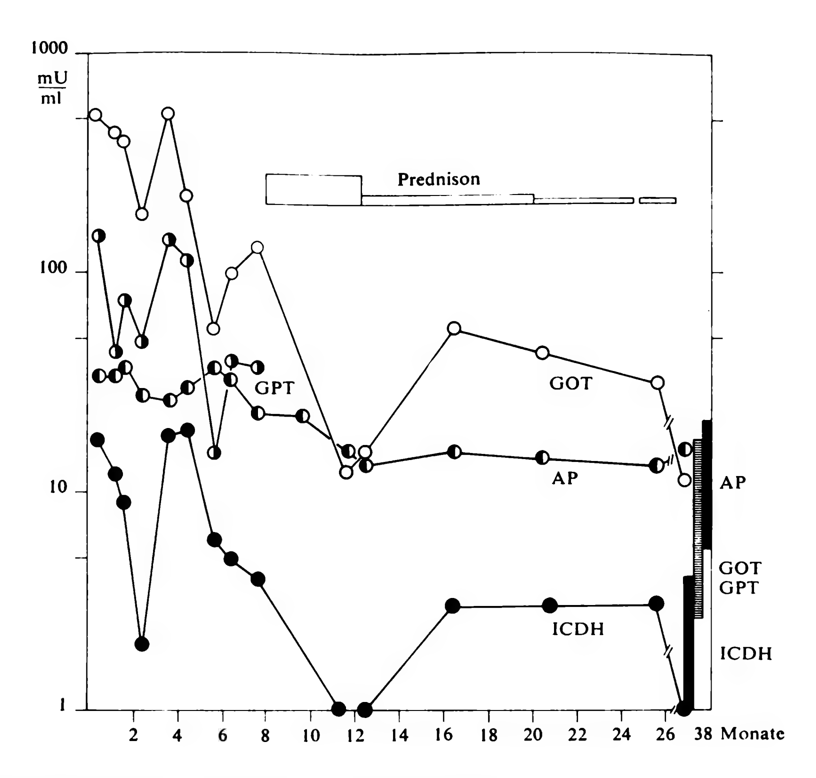


Abb. 38a. Serumenzyme bei chronischer Hepatitis.
Siehe Legende zu Abb. 34 und Text.

einsetzende Besserung des klinischen Bildes und der Laborbefunde auf die Steroidhormonbehandlung zurückzuführen ist, muß unbeantwortet bleiben. Nach den Erfahrungen in der hiesigen Leberabteilung wird ein Erfolg mit Steroidhormonen nur in etwa 25% aller Fälle mit chronischer Hepatitis beobachtet. Der Wiederanstieg von GOT im Plasma fiel mit der Rückkehr der Patientin in einen normalen Tageslauf mit Schulbesuch zusammen.

Seit der letzten Untersuchung mit normalen Enzym- und Serumproteinwerten, vor etwa 18 Monaten, ist die Patientin bei gutem Wohlbefinden.

Leberzirrhose

Bei der aktiven Zirrhose sind nur bei vereinzelten Patienten die Aminotransferasewerte im Normalbereich. Auch bei der mäßig aktiven Zirrhose wird nur bei 1,3% der Patienten eine normale GOT- und bei 8% eine normale GPT-Aktivität festgestellt. Andererseits liegen bei den histologisch

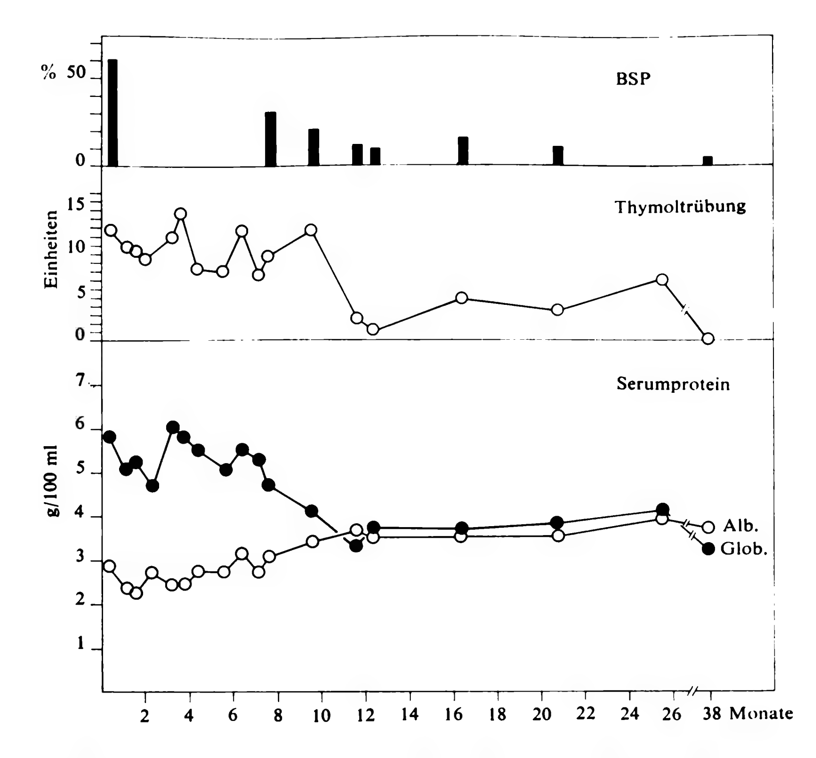


Abb. 38b. Bromsulphaleintest, Thymoltrübungstest und Serumproteine zu dem in Abb. 38a dargestellten Fall.

als weitgehend inaktiv bezeichneten Zirrhosen noch 64% der GOT- und 54% der GPT-Werte im pathologischen Bereich (E. und F. W. Schmidt). Dystrophische Schübe im Verlauf chronischer Lebererkrankungen sind fast ausschließlich von einem stärkeren Anstieg der Aminotransferasen und der GDH, als Ausdruck einer schweren diffusen Parenchymzellschädigung, begleitet.

Leberkoma

Im Leberkoma werden sehr wechselnde Enzymmuster im Plasma beobachtet. Bei der nekrotisierenden Hepatitis und bei dystrophischen Schüben chronischer Lebererkrankungen werden relativ hohe Aminotransferasewerte gefunden, daneben ist auch die GDH-Aktivität erhöht. Tritt der Exitus erst nach einigen Tagen ein, so kommt es zum Absinken von GOT und GPT, während GDH und LDH stark ansteigen. Im Endzustand alter und langdauernder Zirrhosen sind die Enzymanstiege im Plasma meist nur gering.

Hepatosen

Bei Fettleber kommt es mit steigendem Fettgehalt zu einem mäßigen Anstieg der Aminotransferasen. Stärkere pathologische Werte weisen auf das Auftreten sekundärer, entzündlicher Hepatosen hin.

Die cholestatischen Hepatosen sind zu Beginn der Erkrankung durch leicht erhöhte Aminotransferaseaktivitäten bei stark erhöhtem Serumbilirubin gekennzeichnet. Mit zunehmender Leberzellschädigung steigen die Enzymaktivitäten langsam an.

Erkrankungen der Gallenwege

Der Verschlußikterus ist durch mäßigen Anstieg der Aminotransferasen bei relativ hohem Anstieg der GDH und besonders der alkalischen Phosphatase gekennzeichnet. Dennoch finden sich bei einigen Patienten im Krankengut von E. und F. W. Schmidt hohe Transaminasewerte, und die Autoren warnen vor der Irreführung auf eine Hepatitis. Bei der biliären Zirrhose wird in Abhängigkeit von der Stärke der entzündlichen Erscheinungen und der sekundären Parenchymzellschädigung ein recht wechselndes Enzymbild gefunden. Charakteristisch sind aber auch hierbei die im Verhältnis zu GOT und GPT relativ hohen GDH- und Phosphatasewerte.

Differentialdiagnose

In Abbildung 39 sind die Enzymmuster im Serum bei den verschiedenen Lebererkrankungen zusammen mit dem Bilirubinspiegel, der Bromsulphaleinprobe und den Serumproteintesten nebeneinandergestellt. Die Ordinate bezeichnet schattiert den Normalbereich und die pathologischen Werte als ein Vielfaches der Norm. Die Figuren stellen die Häufigkeitsverteilung der Werte für jeden Test bei einem großen Krankengut dar (1500 Patienten mit mehr als 10000 Einzelbestimmungen; E. und F. W. Schmidt).

Es ist leicht einzusehen, daß bei der weiten Spanne der pathologischen Werte die Betrachtung der Aktivität eines einzelnen Enzyms weniger aussagt als die Relation der verschiedenen Teste zueinander.

Die Abbildung spricht für sich selbst, faßt die vorausgegangene Besprechung zusammen und schließt noch einige weitere Krankheitsbilder ein. Hier soll nur auf einige, den praktischen Arzt besonders interessierende Differentialdiagnosen eingegangen werden.

Der Verschlußikterus läßt sich aus dem Enzymmuster gut von der akuten Hepatitis abgrenzen. GOT, GPT und GDH sind bei der akuten Hepatitis in den ersten 2 Krankheitswochen regelmäßig stark erhöht; während beim

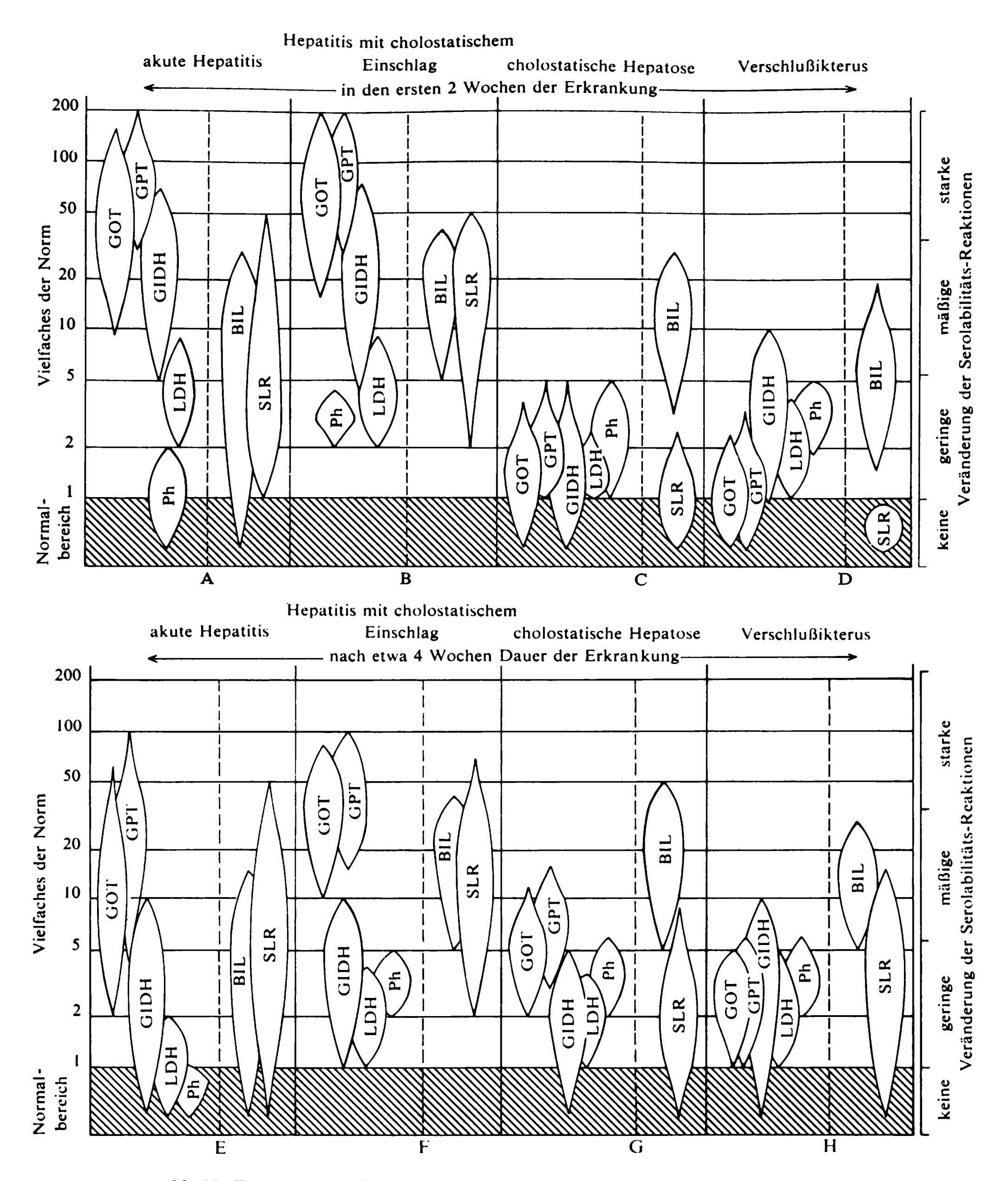
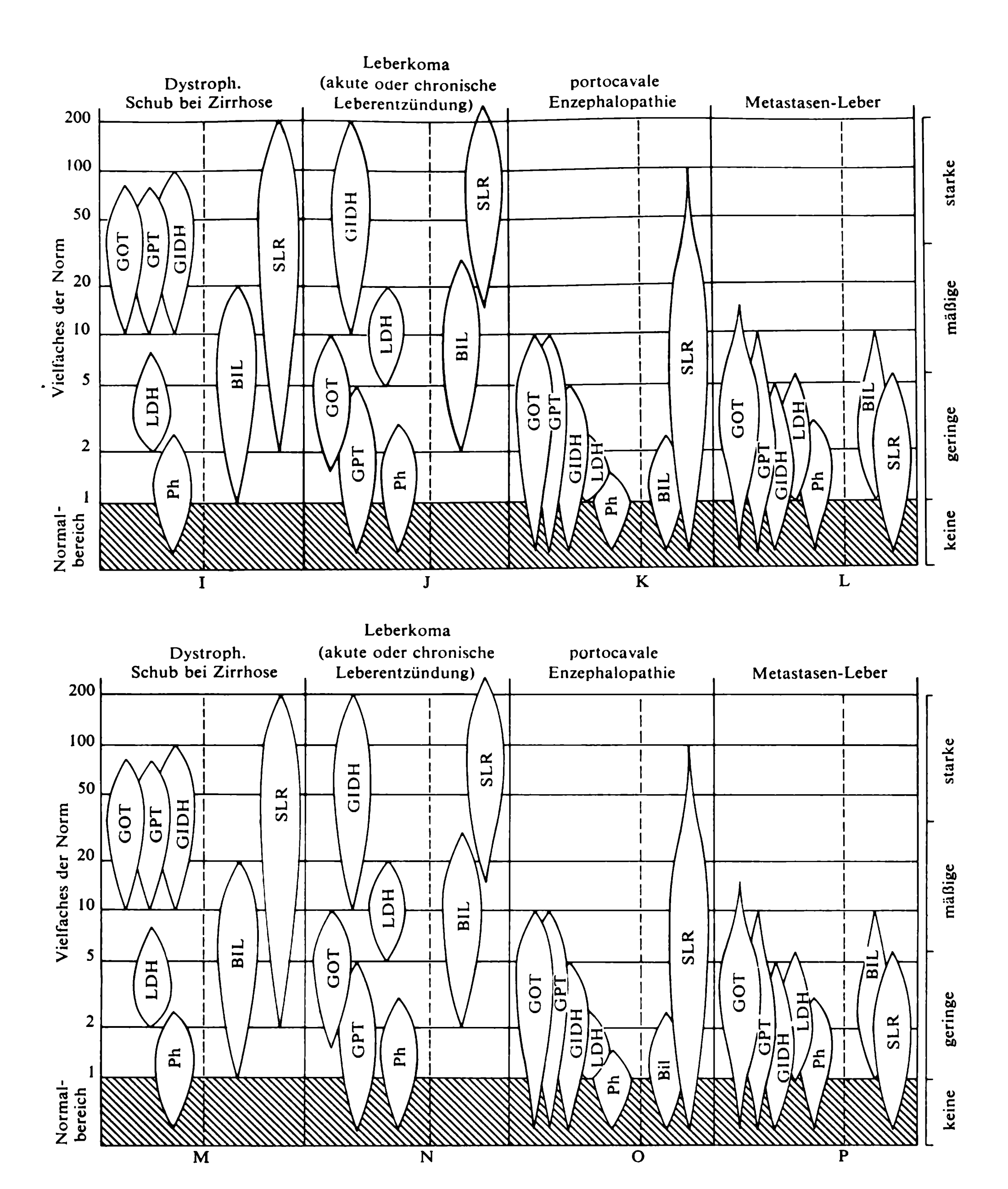


Abb. 39. Enzymmuster im Serum bei Lebererkrankungen.
(Aus E. SCHMIDT, F. W. SCHMIDT, H. D. DORN und U. GERLACH: The importance of the measurement of enzyme activity in medicine. In Methods of enzymatic Analysis;



H. U. BERGMEYER, Herausgeber. Verlag Chemie und Academic Press 1963. Mit Genehmigung der Autoren und des Verlages.) (GIDH = GDH)

Verschlußikterus der Anstieg der Aminotransferasen und der GDH geringer sind. Die Phosphatase steigt dagegen beim Verschlußikterus stärker an. LDH ist zur Beurteilung allein weniger aufschlußreich. Beim Verschlußikterus sind im Gegensatz zur akuten Hepatitis die Serumproteinteste in den ersten Krankheitswochen im Normalbereich (vgl. A mit D). Bei längerer Krankheitsdauer würde die Differentialdiagnose mit der Bewertung nur eines Enzyms sehr viel unsicherer werden, da bei der akuten Hepatitis GOT, GPT und GDH langsam absinken, beim Verschlußikterus dagegen etwas ansteigen. Die Relation der Enzyme zueinander ist aber bei beiden Krankheiten verschieden (vgl. E und H). Gegen die cholestatische Hepatose ist der Verschlußikterus aus den Enzymmustern und den anderen Serumtesten kaum abzugrenzen (vgl. C mit D und G mit H).

Die Differentialdiagnose zwischen akuter Hepatitis und dystrophischem Schub bei chronischen Lebererkrankungen (vgl. A und E mit I) ist ebenfalls nur bei Berücksichtigung der Relation der Enzymaktivitäten möglich. Im allgemeinen übersteigt bei der akuten Hepatitis die GPT-Aktivität die der GOT, während beim dystrophischen Schub beide Enzyme annähernd gleich stark erhöht sind.

Cholinesterase und «leberspezifische» Enzyme

Das Kapitel über Lebererkrankungen wurde mit der Aufzählung von Enzymen eingeleitet, die zur Leberdiagnostik herangezogen werden. An den Untersuchungsergebnissen von E. und F. W. Schmidt wurde dann demonstriert, daß man bei der richtigen Auswahl mit der Bestimmung weniger Enzyme auskommt. Die Relation von GOT, GPT, GDH und LDH zueinander und das Verhalten der alkalischen Phosphatase ergeben differentialdiagnostisch wertvolle Enzymmuster. Die in der Leberabteilung unseres Hospitals übliche Bestimmung von ICDH neben GOT ist nicht sehr aufschlußreich, denn wie die Abbildungen deutlich zeigen, laufen die Aktivitätskurven der beiden Enzyme auffallend ähnlich.

Vier andere Enzyme sind noch wertvoll in der Diagnostik von Leberkrankheiten: Cholinesterase, Sorbitol-dehydrogenase (SDH), Phosphofructaldolase (PFA) und Ornithintranscarbamylase (OCT).

Cholinesterase ist ein plasmaspezifisches Enzym, das in der Leber gebildet wird und dessen Synthese bei Lebererkrankungen vermindert sein kann. So wird bei akuten und chronischen Lebererkrankungen erniedrigte Aktivität im Blutplasma gefunden, während die Werte beim Verschlußikterus im Normalbereich bleiben.

SDH, PFA und OCT sind «leberspezifische» Enzyme, das heißt, ihre Aktivität ist in der Leber viel höher als in allen übrigen Organen. Die OCT ist ein Enzym des Harnstoffzyklus. Die Aktivität ist in der Leber etwa 1000-mal größer als in der Darmschleimhaut und ist in allen anderen Organen nur in Spuren nachzuweisen. SDH hat in der Leber eine 5- bis 50mal höhere Aktivität als in anderen Organen.

Alle drei Enzyme sind im Blutplasma des Gesunden nur mit geringen Aktivitäten unter 1 mU/ml nachweisbar. Bei der akuten Hepatitis werden für SDH, PFA und OCT Aktivitätsanstiege zwischen 5 und 100 mU/ml gefunden. Bei chronischen Lebererkrankungen sind die Werte normal oder geringfügig erhöht. Zu Beginn eines akuten Gallengangverschlusses können SDH und PFA stärker erhöht sein, um aber schon nach wenigen Tagen wieder zur Norm zurückzukehren.

HERZERKRANKUNGEN UND PLASMAENZYME

Enzymbestimmungen im Blutplasma bei Herzerkrankungen und zur Differentialdiagnose bei akuten Schmerzzuständen im Brustraum und im Oberbauch gehören heute zu den Testen, die in jedem Fall ausgeführt werden sollten. Obwohl hier, wie bei den Lebererkrankungen, eine ganze Reihe verschiedener Enzyme Aktivitätssteigerungen im Plasma zeigen, kommt man in der Praxis mit der Bestimmung folgender Enzyme für die Herzdiagnostik aus: GOT, GPT, LDH und CK.

Herzinfarkt

Schon wenige Stunden nach einem Herzinfarkt ist die GOT-Aktivität im Plasma stark erhöht, erreicht nach 12–36 Stunden ein Maximum und geht dann innerhalb von 4–6 Tagen zur Norm zurück. Die Höhe des Anstiegs der GOT-Aktivität scheint mit dem Ausmaß des Infarkts parallel zu gehen, jedenfalls wurde eine solche Korrelation beim experimentellen Herzinfarkt bei Hunden festgestellt. AGRESS stellte an einem großen Krankengut fest, daß bei über 1200 Patienten mit Herzinfarkt 96% erhöhte GOT-Werte im Plasma hatten. GPT ist beim Herzinfarkt im allgemeinen nicht oder nur leicht erhöht. Dies ist aus den GOT/GPT-Quotienten von etwa 18 im Herzmuskel zu erklären (s. Seite 117). Werden stärker erhöhte GPT-Werte im Plasma beim Herzinfarkt gefunden, so ist an eine Stauungsleber zu denken. LDH ist beim Herzinfarkt ebenfalls erhöht. Das Maximum des Aktivitätsanstieges fällt mit dem der GOT zusammen, LDH geht aber etwas langsamer auf normale Werte zurück.

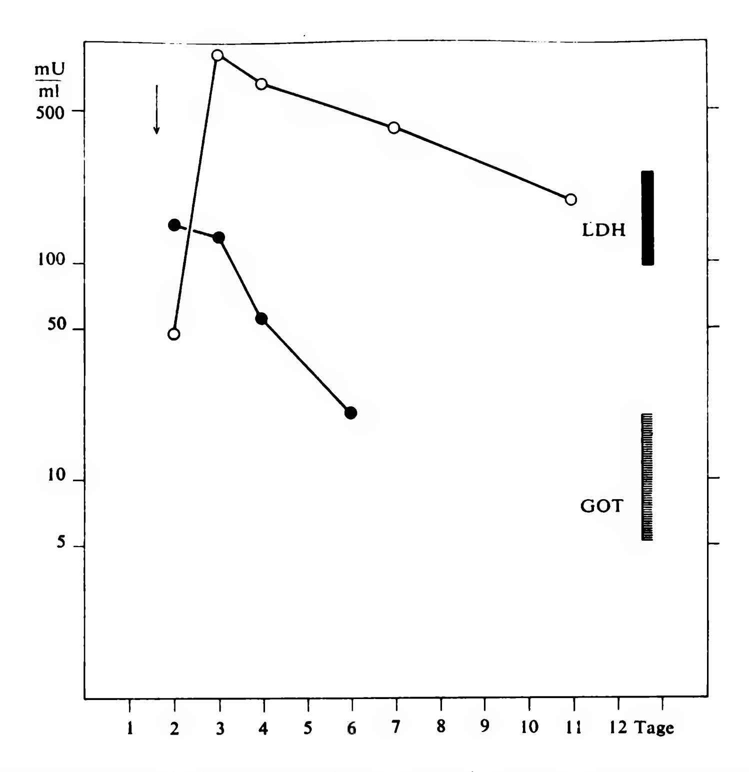


Abb. 40. Lactat-dehydrogenase und Aspartat-aminotransferase im Serum bei Herzinfarkt. Die Balken bezeichnen den Normalbereich. Siehe Text.

Erleidet ein Patient mit einer Lebererkrankung einen Herzinfarkt, so lassen sich GOT, GPT und LDH allein nicht zur Diagnose verwerten. Hier leistet dann die Creatin-kinase (CK) gute Dienste. Die CK-Aktivität ist beim Herzinfarkt um das 10- bis 25fache der Norm erhöht. Das Aktivitätsmaximum wird wie bei GOT nach 12–36 Stunden erreicht, fällt aber dann sehr rasch auf normale Werte zurück. CK ist ein muskelspezifisches Enzym, das außer beim Herzinfarkt nur noch bei der progressiven Muskeldystrophie im Plasma mit erhöhter Aktivität gefunden wird.

Der prompte Anstieg der Enzyme im Plasma nach einem Herzinfarkt und die relativ rasche Rückkehr zu normalen Werten machen es notwendig, daß die Enzymbestimmungen so bald als möglich nach dem Infarkt angestellt und in den nächsten beiden Tagen wiederholt werden. Ein mehrere Tage zurückliegender Herzinfarkt läßt sich meist an den Plasmaenzymen nicht mehr mit Sicherheit diagnostizieren.

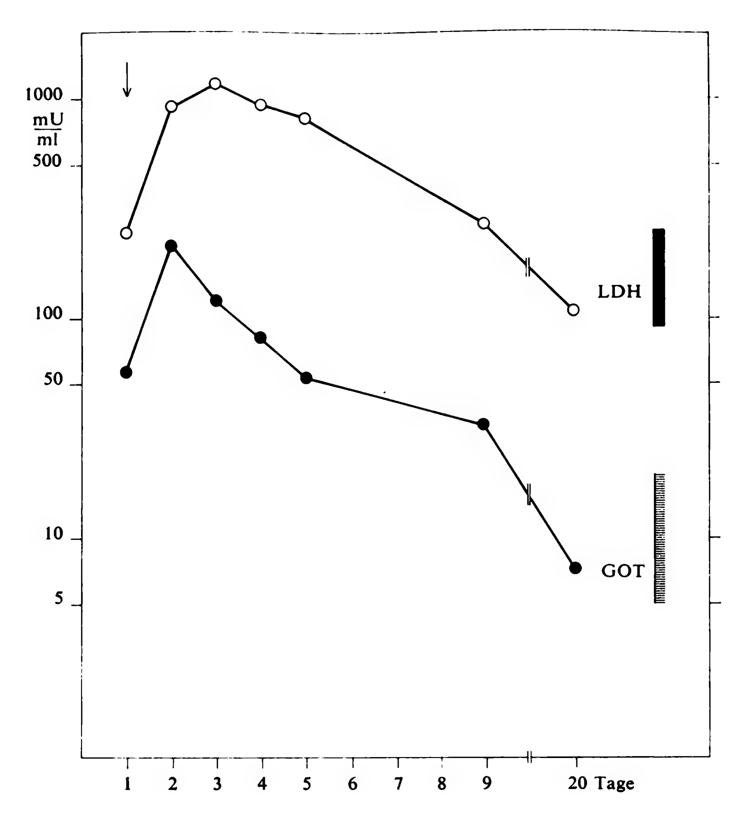


Abb. 41. Lactat-dehydrogenase und Aspartat-aminotransferase im Serum bei Herzinfarkt. Siehe Text.

Angina pectoris und Koronarinsuffizienz

Bei Angina pectoris und Koronarinsuffizienz werden normale Werte für GOT, LDH und CK im Plasma gefunden. Erhöhte Werte sprechen für einen Herzinfarkt.

Im folgenden sind drei Enzymkurven von Patienten wiedergegeben, die in der Kardiologischen Abteilung (Prof. Dr. J. GRAETTINGER) des Presbyterian-St. Luke's Hospitals behandelt wurden. Bei allen Herzkranken werden GOT und LDH routinemäßig bestimmt. Abbildung 40: Die 71-jährige, vorher herzgesunde Patientin erlitt morgens einen akuten Schmerzanfall im Brustraum und wurde kurze Zeit später mit der Diagnose Herzinfarkt aufgenommen. Die Patientin erholte sich unter der Behandlung schnell. GOT zeigte 6 Stunden nach dem Anfall bereits ein Maximum und war am 5. Tage wieder normal. Der Gipfel der LDH-Aktivität wurde erst

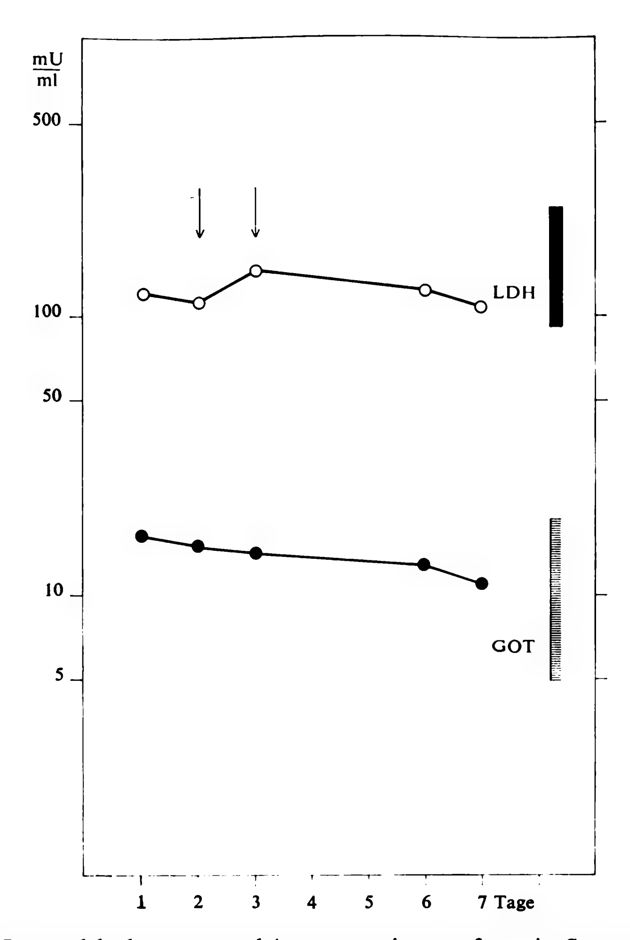


Abb. 42. Lactat-dehydrogenase und Aspartat-aminotransferase im Serum bei Angina pectoris.

am 2. Tage erreicht, und die Aktivität ging parallel zur GOT zur Norm zurück.

Abbildung 41: Die 56jährige Patientin befand sich seit Monaten in stationärer psychiatrischer Behandlung in unserem Hospital. Am Morgen des 7. März erlitt sie einen akuten Schmerzanfall im Brustraum, begleitet von einem schweren Schockzustand. Der Blutdruck blieb für mehrere Tage stark erniedrigt und machte die kontinuierliche Verabreichung von Vasopressoren notwendig. Vorübergehend bestand ein Lungenödem. Differentialdiagnostisch wurden Lungeninfarkt und Herzinfarkt in Betracht gezogen. Im Ekg bestand 6 Stunden nach dem Herzanfall ein atrioventriku-

Tabelle 17. Serumenzyme bei einem Patienten mit Herzinfarkt. Aktivitäten in mU/ml (32 °C)

Zeit nach Infarkt	GOT	GPT	LDH	CK	ICDH
7 Stunden	18	12	206[1]	8	1,8
14 Stunden	70	19	350	96	1,8
19 Stunden	136	23	605	157	1,8
25 Stunden	*154*	25	730[2]	158	1,8
30 Stunden	146	*27*	696	*225*	1,5
36 Stunden	106	25	744	62	1,4
48 Stunden	92	24	*768*	31	1,1
54 Stunden	65	20	605	41	1,1
3 Tage	35	15	528	13	1,0
4 Tage	21	13	422	6	1,4
6 Tage	14	12	317	2	1,7
8 Tage	13	11	298	2	1,6
10 Tage	11	10	250	2	1,6
12 Tage	10	8	202[3]	2	1,7

LDH-isoenzyme [1] normal
[2] Herztyp (LDH-1 und LDH-2 erhöht)
[3] normal

Die CK-Bestimmung wurde nach NIELSEN und LUDWIGSEN (J. Lab. Clin. Med. 62, 159, 1963) durchgeführt. Diese Methode weicht von der auf Seite 149 angegebenen Testvorschrift ab und ergibt Normalwerte zwischen 2 und 17 mU/ml, im Vergleich mit Normalwerten zwischen 0,5 und 1 mU/ml mit der anderen Methode.

lärer Block, der nach 2 Tagen unter Atropinbehandlung wieder verschwand. Sonst fanden sich keine für Herzinfarkt typische Veränderungen. Ein Lungeninfarkt wurde röntgenologisch ausgeschlossen. Der Verlauf der Serumenzymkurven ist typisch für einen Herzinfarkt, da aber anfangs Zweifel an der Diagnose bestanden, hätte hier die Bestimmung von Creatin-kinase geholfen. Die Diagnose Herzinfarkt wurde schließlich aus dem vorübergehenden AV-Block und dem Verhalten der Enzyme GOT und LDH gestellt.

Abbildung 42: Der 71jährige Patient hat eine längere Anamnese mit kompensierter Herzinsuffizienz. Seit 3 Jahren traten gelegentlich Angina-pectoris-Anfälle auf, die mit Nitroglycerin kupiert wurden. Die Anfälle häuften sich in der letzten Zeit und nahmen an Schwere zu. Der Patient wurde zur Beobachtung aufgenommen. Die Aktivitäten von LDH und GOT waren während der Beobachtungszeit normal. Der Patient hatte während des Aufenthaltes im Hospital zwei Schmerzanfälle. Eventuelle

kleinere Herzinfarkte wurden auf Grund des Ekg und des normalen Enzymbildes ausgeschlossen.

In Tabelle 17 sind die Serumenzymwerte für GPT, GOT, LDH, CK und ICDH bei einem Patienten, der 7 Stunden nach erlittenem Herzinfarkt zur Aufnahme kam, aufgeführt. CK zeigte den prozentual schnellsten und stärksten Anstieg. GPT war nur wenig erhöht, und ICDH blieb während der ganzen Zeit im Normalbereich. Die LDH-Aktivität zeigte zwei Gipfel, nach 25 und nach 48 Stunden. Das LDH-Isoenzymmuster war nach 7 Stunden noch normal, zeigte nach 25 Stunden den Herztyp (LDH-1 und LDH-2 erhöht) und war nach 12 Tagen wieder normal. GOT, LDH und CK verhalten sich beim Herzinfarkt ziemlich gleich. LDH hat den Vorteil, daß zusätzlich das Isoenzymmuster zur Differentialdiagnose herangezogen werden kann. CK steigt außer beim Herzinfarkt nach den bisherigen Kenntnissen nur noch bei bestimmten Muskelerkrankungen (s. Seite 136) im Blutplasma an. Die Bestimmung dieses Enzyms ist daher, sofern sie innerhalb der ersten 2 Tage nach dem Herzanfall ausgeführt wird, ein ausgezeichneter Indikator beim Herzinfarkt.

Andere Herzkrankheiten

Rheumatische Myokarditis, infektiöse Myokarditis und Arrhythmie sind nicht von Enzymaktivitätsanstiegen im Plasma begleitet, das gleiche gilt von der Perikarditis. Die toxische Myokarditis ist durch Enzymanstiege im Plasma, als Zeichen einer Muskelnekrose, gekennzeichnet. Bei dekompensierter Herzinsuffizienz werden erhöhte GOT, GPT und LDH gefunden, doch ist der Anstieg auf die sekundäre Leberschädigung zurückzuführen.

DIFFERENTIALDIAGNOSE AKUTER SCHMERZZUSTÄNDE IM BRUST- UND OBEREN BAUCHRAUM

Läßt das klinische Bild, das Ekg und die GOT-Aktivität im Plasma noch Zweifel an einem Herzinfarkt, so sollte CK bestimmt werden. Sofern es sich nicht um einen mehrere Tage zurückliegenden Infarkt handelt, wird die CK-Aktivität erhöht gefunden. Beim Lungeninfarkt können die Transaminasen und LDH langsam als Ausdruck einer sekundären Leberbeteiligung ansteigen. Das Lungengewebe selbst ist arm an Enzymen und trägt anscheinend nur unbedeutend zur Aktivität der Enzyme im Plasma bei.

Perikarditis, Mediastinitis und Pleuritis sind nicht von Enzymanstiegen im Plasma begleitet.

Bei der akuten Pankreatitis kann zwar die GOT-Aktivität im Plasma erhöht sein, sie läßt sich aber leicht an der stets im Plasma und im Urin erhöhten Amylaseaktivität erkennen. Eine Gallensteinkolik ist beim vorher Lebergesunden nicht von Enzymanstiegen im Plasma begleitet, die Aktivität der Enzyme steigt erst bei sekundärem Leberschaden an. Beim Gallengangverschluß steigen die «leberspezifischen» Enzyme SDH und PFA im Plasma an und können differentialdiagnostisch verwertet werden.

LDH-ISOENZYME UND DIFFERENTIALDIAGNOSE

Die Muster der LDH-Isoenzyme im Serum und in verschiedenen Organen des Menschen wurden bereits auf Seite 28 (Tab. 4) besprochen. Tritt aus den Zellen eines erkrankten Organs vermehrt LDH ins Blut über, so werden die in dem betreffenden Organ vorkommenden Isoenzyme im Serum erhöht gefunden. In der Leber dominieren LDH-4 und LDH-5. Bei Lebererkrankungen wird daher beobachtet, daß die Erhöhung der LDH-Gesamtaktivität hauptsächlich auf LDH-4 und LDH-5 zurückzuführen ist. Da diese beiden Isoenzyme im Serum des Gesunden nur in sehr kleinen Mengen vorkommen und im Enzym-Elektropherogramm gerade eben sichtbar sind, läßt sich ihre Aktivitätssteigerung leicht an der stärkeren Färbung der Bänder erkennen. Die genaue Bestimmung der prozentualen Aktivitätsverteilung ist mit dem Densitometer möglich. Beim Herzinfarkt werden dagegen LDH-1 und LDH-2 vermehrt im Serum gefunden. Da die beiden Isoenzyme aber schon im normalen Serum am stärksten vertreten sind, ist die Aktivitätszunahme nicht immer mit bloßem Auge wahrzunehmen.

Hämolytische Anämien sind ebenfalls durch den Anstieg von LDH-1 und LDH-2 gekennzeichnet. Beide Isoenzyme sind in den Erythrozyten prozentual am stärksten vertreten.

Maligne Tumoren führen in vielen Fällen zu Aktivitätssteigerungen von LDH-2, LDH-3 und LDH-4 im Serum. Aber auch bei Infektionskrankheiten, zum Beispiel Mononukleose, steigen diese drei Isoenzyme im Serum an.

ALKALISCHE PHOSPHATASE BEI KNOCHENERKRANKUNGEN

Erhöhte Osteoblastentätigkeit führt zum Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum. Bei Kindern ist die Aktivität dem Wachstum entsprechend hoch. Wird das Wachstum unterbrochen, zum Beispiel beim Kretinismus, so fallen die Werte der alkalischen Phosphatase auf die des Erwachsenen zurück.

Unter den Knochenerkrankungen ist die Ostitis deformans durch hohe alkalische Phosphatasewerte im Serum gekennzeichnet. Geringere Anstiege werden bei der Ostitis fibrosa generalisata (Hyperparathyreoidismus) beobachtet. Während aber bei der Ostitis deformans der Calcium- und Phosphatspiegel im Serum normal ist, werden erhöhtes Calcium und erniedrigtes Phosphat beim Hyperparathyreoidismus gefunden.

Rachitis und Osteomalazie sind von hohen Phosphatasewerten im Serum begleitet.

Anstieg der Aktivität wird auch bei malignen Knochentumoren mit Osteoblastentätigkeit gefunden.

SAURE PHOSPHATASE BEI PROSTATAKARZINOM

Zur Diagnose des Prostatakarzinoms ist die Bestimmung der sauren Phosphatase im Serum sehr wertvoll. Die Aktivität der sauren Phosphatase ist im Prostatagewebe sehr viel höher als in anderen Organen und kann als «organspezifisch» für die Prostata aufgefaßt werden.

Bei der einfachen Prostatahypertrophie und bei der Prostatitis steigt die Aktivität der sauren Phosphatase nicht an. Beim Prostatakarzinom ohne Metastasen ist die saure Phosphatase bei 10–20% der Patienten erhöht, bei Prostatakarzinom mit Knochenmetastasen bei 80%. Von großem Wert ist die Bestimmung der sauren Phosphatase bei Patienten mit Knochenmetastasen. Ist die saure Phosphatase erhöht, so deutet dies mit großer Sicherheit auf ein primäres Prostatakarzinom.

CREATIN-KINASE BEI DER PROGRESSIVEN MUSKELDYSTROPHIE

Von den drei Typen der progressiven Muskeldystrophie – I = facio-scapulo-humeral; II = Gliedmaßengürtel; III = Aran-Duchenne – ist nur Typ III von einem stärkeren Anstieg der Creatin-kinase-Aktivität im Serum ausgezeichnet. Daneben können (bei Typ III) Aldolase, GPT, GOT und LDH erhöht sein. Für LDH läßt sich im Enzymelektropherogramm zeigen, daß der Anstieg durch LDH-4 und LDH-5 (dominierend im Muskel) bedingt ist.

Durch Erkrankungen des Nervensystems hervorgerufene Muskelerkrankungen sind nicht von einem Anstieg der Creatin-kinase oder der anderen erwähnten Enzyme begleitet.

Bis vor wenigen Jahren war die Amylase das einzige Enzym, das im Urin zur Diagnose von Pankreaserkrankungen diente. Über das Vorkommen anderer Enzyme wurde gelegentlich berichtet, doch waren die Ergebnisse selbst in ein und demselben Laboratorium zu widerspruchsvoll, um sie diagnostisch auswerten zu können. Erst kürzlich gelang WACKER die Entdeckung und Isolierung von Enzyminhibitoren im Urin. Auf der Suche nach einem Enzymtest für maligne Tumoren in der Niere und in den ableitenden Harnwegen wurde zunächst festgestellt, daß im Urin von gesunden Personen *nach Dialyse* (zur Entfernung der Inhibitoren) Lactat-dehydrogenase und alkalische Phosphatase mit gut meßbarer Aktivität vorkommen. Der Normalbereich für LDH liegt zwischen 260 und 1000 mU/ 8-Std.-Urinvolumen, für alkalische Phosphatase zwischen 1700 und 6300 Einheiten/8-Std.-Urinvolumen (Umrechnung in mU ist aus den Angaben über die Methode nicht möglich). Als Inhibitoren der LDH isolierte WAKKER zwei Polypeptide, von denen das eine spezifisch LDH-1, das andere LDH-5 hemmt.

Bei der Mehrzahl aller untersuchten Patienten mit malignen Tumoren der Niere oder der ableitenden Harnwege waren die Aktivitäten der LDH und der alkalischen P-ase erhöht. Harnblasenkarzinome waren von erhöhter LDH bei normaler alkalischer P-ase begleitet.

Wie zu erwarten war, werden diese Enzyme aber auch bei anderen Erkrankungen der Niere vermehrt im Urin ausgeschieden, was bei dem Enzymgehalt der Tubuluszellen (s. Kapitel Enzymologie der Organe: Niere) nicht verwunderlich ist. Bei allen daraufhin untersuchten Patienten bestand kein Zusammenhang zwischen der Aktivität der LDH im Urin und der LDH im Blutserum. Auch Proteinurie war ohne Einfluß. Demnach darf man annehmen, daß die LDH im Urin aus den Zellen des Urogenitalsystems stammt. Geringfügige Hämaturie erhöht die LDH-Werte nicht.

Die Aktivität der LDH war im Krankengut von WACKER bei den meisten Patienten mit interstitiellen oder parenchymatösen Nierenerkrankungen erhöht. Nur bei benignem essentiellem Hochdruck und bei benignen Nierenzysten wurden Normalwerte im Harn gefunden. Erhöhte LDH-Aktivität im Urin wurde von WACKER bei folgenden Nierenerkrankungen im Urin gemessen: chronische Pyelonephritis (unabhängig von Bakteriurie), akute und chronische Glomerulonephritis, sklerotisierende Glomerulonephritis, Glomerulonephritis bei Diabetes mellitus, progressive Nierenbeteiligung bei generalisiertem Lupus erythematosus.

Obwohl die Untersuchungen an einem relativ großen Krankengut vorgenommen wurden, bedürfen die Ergebnisse noch der Bestätigung durch andere Untersucher. Der Wert der Bestimmung von LDH und wahrscheinlich auch von alkalischer P-ase liegt in der Anwendung bei Reihenuntersuchungen. Erhöhte Werte deuten auf eine Nierenerkrankung oder Erkrankung der ableitenden Harnwege hin. Die chronische Pyelonephritis zum Beispiel blieb bisher bei vielen Patienten unentdeckt, sie sollte mit der LDH-Bestimmung im Urin jetzt häufiger diagnostiziert werden. Für die Früherkennung von Karzinomen im Urogenitalsystem ist durch diese einfach durchzuführenden Enzymbestimmungen ein überaus wichtiges diagnostisches Hilfsmittel erkannt worden.

WACKERS Arbeiten sind nicht unwidersprochen geblieben, aber in keiner der Entgegnungen war die Frage der Inhibitoren entsprechend berücksichtigt worden. Es ist abzusehen, daß in Zukunft noch viele andere Enzyme im Urin zur Diagnostik herangezogen werden, aber es ist entscheidend, dabei die Inhibitoren zu beachten.

LITERATUR

Enzymes in Clinical Chemistry. Proceedings of the Second International Symposium on enzymes in clinical chemistry. Ghent, Belgium, April 1961. Butterworth, London 1962.

Enzymes in Clinical Chemistry. West-European Symposia on clinical chemistry, Vol. *4*. Herausgeber: R. RUYSSEN und L. VANDENDRIESSCHE. Elsevier publishing Company, Amsterdam, London, New York 1965.

B. HESS: Enzymes in Blood Plasma. Academic Press, New York 1963. (Enzyme im Blutplasma. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1962.)

J. H. WILKINSON: An Introduction to Diagnostic Enzymology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1962.

R. RICHTERICH: Enzympathologie, Enzyme in Klinik und Forschung. Springer-Verlag, Berlin 1958.

Symposium on diagnostic enzymology. Herausgeber: F. WROBLEWSKI. Am. J. Med. *27*, 849–936, 1959.

E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT: Enzymbestimmungen im Serum bei Lebererkrankungen. Enzymol. Biol. Clin. *3*, 1, 1963.

C. M. AGRESS: Evaluation of the transaminase test. Am. J. Cardiol. *3*, 74, 1961.

R. H. S. THOMPSON und E. J. KING: Biochemical Disorders in Human Disease. Second Edition. Academic Press, New York 1964.

R. ABDERHALDEN: Klinische Enzymologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958.

U. AEBI, R. RICHTERICH, H. STILLHART, J. P. COLOMBO und E. ROSSI: Progressive Muskeldystrophie. III. Serumenzyme bei der Muskeldystrophie im Kindesalter. Helv. paed. Acta *16*, 543, 1961.

W. E. C. WACKER und L. E. DORFMAN: Urinary Lactic Dehydrogenase Activity. I. Screening method for detection of cancer of kidneys and bladder. J. Am. Med. Assoc. *181*, 972, 1962.

W. E. C. WACKER, L. E. DORFMAN und E. AMADOR: Urinary Lactic Dehydrogenase Activity. IV. Screening test for detection of renal disease and of arterial hypertension associated with renal disease. J. Am. Med. Assoc. *188*, 671, 1964.

W. E. C. WACKER: Urinary enzymes as diagnostic aids. Clin. Chem. *11*, 825, 1965.

R. S. RIGGINS und W. S. KISER: A study of lactic dehydrogenase in urine and serum of patients with urinary tract disease. J. Urology *90*, 594, 1963.

PRAKTISCHE HINWEISE ZUR ENZYMBESTIMMUNG IM BLUTPLASMA ODER -SERUM

BLUTENTNAHME

Enzyme können im Serum oder Plasma bestimmt werden. Bei der Gewinnung von Plasma ist zu berücksichtigen, daß Antikoagulantien Enzyme hemmen können. Oxalat hemmt LDH, Citrat hemmt Amylase, Fluorid hemmt einige Enzyme der Glycolyse. Heparin hemmt keines der normalerweise im klinisch-chemischen Routinelabor bestimmten Enzyme, ist also das Antikoagulans der Wahl.

Kann Blut nicht aus der Vene entnommen werden, besonders bei Säuglingen, so gewinnt man Kapillarblut aus Ohrläppchen, Fingerbeere oder Ferse. Man läßt das Blut in ein Hämatokritröhrchen fließen und zentrifugiert in einer Hämatokritzentrifuge. An der Grenze zu den sedimentierten Zellen wird das Röhrchen auseinandergebrochen. Für die so gewonnenen kleinen Mengen an Plasma oder Serum stehen Mikrolitermethoden zur Enzymbestimmung zur Verfügung.

Hämolyse ist unbedingt zu vermeiden, da Erythrozyten sehr reich an Enzymen sind. Man wird also Blut sofort nach der Gerinnung und Heparinblut sofort nach der Gewinnung zentrifugieren.

Kann die Enzymbestimmung nicht sofort durchgeführt werden, so muß das Serum bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Stabilität der Enzyme ist verschieden. Einige werden bei Zimmertemperatur schon nach wenigen Stunden inaktiviert, andere sind stabil. Bei 4 °C können die meisten Enzyme ohne größeren Aktivitätsverlust 1 oder 2 Tage aufbewahrt werden, die Bestimmung am Tage der Blutentnahme ist aber anzustreben.

PRINZIP DES OPTISCHEN TESTS

Dehydrogenasen, Aminotransferasen und einige andere Enzyme können mit dem optischen Test bestimmt werden. Es wird dabei von der Lichtabsorption der an der Reaktion beteiligten Nicotinamid-adenin-nucleotide Gebrauch gemacht. NAD und NADP haben im reduzierten Zustand ein Absorptionsmaximum bei 340 nm, während die oxydierten Formen zwischen 300 und 400 nm nicht absorbieren. Bei 366 nm, einer häufig gebrauchten Wellenlänge zur NADH-(NADPH-)Bestimmung, beträgt die Licht-

absorption etwa die Hälfte und ist für die meisten Enzymbestimmungen ausreichend.

Aus der im Photometer bei 340 oder 366 nm gemessenen Zu- oder Abnahme der Extinktion kann mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten der Umsatz von Nicotinamid-adenin-nucleotiden berechnet werden.

Neben dem «einfachen» optischen Test, mit dem Enzyme bestimmt werden, deren Coenzym NAD oder NADP ist (z. B. LDH), wird der «gekoppelte» optische Test angewandt. Hier wird von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, ein Reaktionsprodukt der zu bestimmenden Enzymreaktion in einer von NAD oder NADP abhängigen Enzymreaktion weiterreagieren zu lassen (z. B. Aminotransferasen).

Die im folgenden beschriebenen Enzymteste sind auf das Kapitel «Enzyme im Blutplasma» abgestimmt. Für andere Methoden sei auf die unten angegebene Literatur verwiesen.

LACTAT-DEHYDROGENASE [LDH]

Prinzip:

LDH katalysiert die Reaktion

$$\text{Lactat} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf seiten des Lactats. $NADH_2$ wird in stöchiometrischem Verhältnis oxydiert und ist die Meßgröße.

Reagenzien:

A. Phosphatpuffer, 0,05 M, pH 7,5 mit Pyruvat $3{,}1 \times 10^{-4}$ M.
   In 80 ml doppelt destilliertem Wasser werden gelöst: 700 mg K_2HPO_4, 90 mg KH_2PO_4 und 3 mg Na-pyruvat.

B. $NADH_2$-Lösung, 8×10^{-3} M β-$NADH_2$. 10 mg $NADH_2$-Na_2 werden in 1,5 ml Lösung A gelöst.

Durchführung der Bestimmung:

Benötigte Serummenge: 0,100 ml, frisch und unbedingt hämolysefrei. Serum und Reagenzien werden in einem Wasserbad auf 25 °C temperiert. In eine 10-mm-Küvette pipettieren:

2,85 ml Phosphatpuffer-Pyruvat (A)
0,05 ml $NADH_2$ (B)
0,10 ml Serum

Sofort mit abgeflachtem Glas- oder Polyäthylenstab mischen und Extinktion bei 366 oder 340 nm über 5 Minuten jede Minute ablesen (Stoppuhr). Ein Leerwert braucht nicht eingesetzt zu werden. Die Extinktionsänderung soll 0,020 pro Minute nicht überschreiten. Gegebenenfalls ist das Serum mit Lösung A zu verdünnen. Bei der Berechnung muß der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Berechnung:

Die Extinktionsänderung pro Minute ($\Delta E/min$) wird graphisch oder durch Bildung des Mittelwertes aus den Ablesungen ermittelt. Messung bei

$$366 \text{ nm} \quad \Delta E/min \times 9090 = m\mu Mol/ml \times min. \ (mU/ml)$$
$$340 \text{ nm} \quad \Delta E/min \times 4800 = m\mu Mol/ml \times min. \ (mU/ml)$$
$$334 \text{ nm}^* \ \Delta E/min \times 4980 = m\mu Mol/ml \times min. \ (mU/ml)$$

(* ersetzt 340 nm im Photometer Eppendorf)

Normalwerte im Serum:

95–250 mU/ml

Die Reagenzien zur LDH-Bestimmung können von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, als fertige «Test-Kombination» bezogen werden.

ALANIN-AMINOTRANSFERASE [ALAT = GPT]

Prinzip:

GPT katalysiert die Reaktion

$$\text{Glutamat} + \text{Pyruvat} \rightleftharpoons \text{Alanin} + \text{2-Oxoglutarat}$$

In der von rechts nach links verlaufenden Reaktion wird die zeitliche Zunahme von Pyruvat mit Hilfe einer Indikatorreaktion bestimmt. Pyruvat wird durch zugesetzte LDH und $NADH_2$ zu Lactat reduziert:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + NAD^+$$

$NADH_2$ wird in äquimolaren Mengen oxydiert und ist Meßgröße.

Reagenzien:

A. Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4 mit Alanin 0,11 M. In 100 ml doppelt destilliertem Wasser werden gelöst: 0,2 g KH_2PO_4, 1,5 g K_2HPO_4 und 1,0 g DL-Alanin.

B. 2-Oxoglutarat-Lösung, ca. 0,2 M. 114 mg Na-2-Oxoglutarat oder 87,5 mg 2-Oxoglutarsäure in ca. 2 ml doppelt destilliertem Wasser lösen, pH 7,4 mit 1 N-NaOH einstellen und auf 3 ml auffüllen.
C. $NADH_2$-Lösung, $1{,}2 \times 10^{-2}$ M. 15 mg β-$NADH_2$-Na werden in 1,5 ml Lösung A gelöst.
D. Lactat-dehydrogenase (LDH), 0,5 mg Protein/ml. Enzympräparat zur GPT-Bestimmung der Firma C. F. Boehringer unverdünnt verwenden.

Durchführung der Bestimmung:

Benötigte Serummenge: 1 ml, frisch und hämolysefrei.
In eine 10-mm-Küvette pipettieren:

1,80 ml Phosphatpuffer-Alanin (A)
0,05 ml $NADH_2$ (C)
0,05 ml LDH (D)
1,00 ml Serum

Mit abgeflachtem Glas- oder Polyäthylenstab mischen und für 10 Minuten in ein Wasserbad bei 25 °C stellen. Serumeigenes Pyruvat reagiert mit LDH und $NADH_2$. Küvette ins Photometer einsetzen. Tritt keine Extinktionsabnahme mehr ein, dann werden

0,10 ml 2-Oxoglutarat (B)

eingemischt. Die GPT-Reaktion ist jetzt gestartet. Die Extinktionsänderung wird über 10 Minuten jede Minute abgelesen (Stoppuhr). Ein Leerwert wird nur angesetzt, wenn das Serum stark gefärbt ist (z. B. Bilirubin). Man mischt in einer Küvette 1,0 ml Serum mit 2,0 ml Wasser und stellt mit dieser Küvette im Strahlengang $E = 0{,}000$ ein. Steht nicht genügend Serum zur Verfügung, so wird zu 3 ml Wasser soviel von der $NADH_2$-Lösung zugesetzt, daß die Extinktionsdifferenz zwischen diesem Leerwert und dem Enzymansatz vor Zugabe von 2-Oxoglutarat 0,5–0,6 beträgt.

Berechnung:

Die Extinktionsdifferenz pro Minute (ΔE/min) wird graphisch oder durch Bildung des Mittelwertes aus den Ablesungen ermittelt. Messung bei

366 nm $\Delta E/\text{min} \times 909 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
340 nm $\Delta E/\text{min} \times 480 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
334 nm* $\Delta E/\text{min} \times 498 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)

(* ersetzt 340 nm im Photometer Eppendorf)

Normalwerte im Serum:

3–18 mU/ml

Die Reagenzien zur GPT-Bestimmung können als fertige «Test-Kombination» von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen werden.

ASPARTAT-AMINOTRANSFERASE [AspAT = GOT]

Prinzip:

GOT katalysiert die Reaktion

$$\text{Glutamat} + \text{Oxalacetat} \rightleftharpoons \text{Aspartat} + \text{2-Oxoglutarat}$$

In der von rechts nach links verlaufenden Reaktion wird die zeitliche Zunahme von Oxalacetat mit Hilfe einer Indikatorreaktion bestimmt. Oxalacetat wird durch zugesetzte Malat-dehydrogenase (MDH) und $NADH_2$ zu Malat reduziert

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + H^{+} \rightleftharpoons \text{Malat} + \text{NAD}^{+}$$

$NADH_2$ wird in äquimolaren Mengen oxydiert und ist Meßgröße.

Reagenzien:

A. Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,6 mit Aspartat 0,25 M. In 100 ml doppelt destilliertem Wasser werden gelöst: 0,175 g KH_2PO_4, 1,742 g K_2HPO_4 und 3,9 g Na-L-Aspartat oder 3,3 g Asparaginsäure. Bei Veränderung der freien Säure muß das pH mit 1 N-NaOH auf 7,6 eingestellt werden.

B. 2-Oxoglutarat-Lösung ca. 0,2 M. 114 mg Na-2-Oxoglutarat oder 87,5 mg 2-Oxoglutarsäure in ca. 2 ml doppelt destilliertem Wasser lösen. pH mit 1 N-NaOH auf 7,6 einstellen und auf 3 ml auffüllen.

C. $NADH_2$-Lösung, $1{,}2 \times 10^{-2}$ M. 15 mg β-$NADH_2$-Na werden in 1,5 ml Lösung A gelöst.

D. Malat-dehydrogenase (MDH), 0,5 mg Protein/ml.
Enzympräparat zur GOT-Bestimmung der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, unverdünnt verwenden.

Durchführung der Bestimmung:

Benötigte Serummenge: 0,5 ml, frisch und hämolysefrei. In eine 10-mm-Küvette pipettieren:

2,30 ml Puffer-Aspartat (A)
0,05 ml $NADH_2$ (C)

0,05 ml MDH (D)
0,50 ml Serum

Mit abgeflachtem Glas- oder Polyäthylenstab mischen und für 10 Minuten in ein Wasserbad bei 25 °C stellen. Serumeigene Substrate (Pyruvat, Oxalacetat usw.) reagieren mit serumeigenen Enzymen und MDH unter $NADH_2$-Verbrauch. Küvette ins Photometer einsetzen. Tritt keine Extinktionsänderung mehr auf, dann werden

0,10 ml 2-Oxoglutarat (B)

eingemischt. Die GOT-Reaktion ist jetzt gestartet. Die Extinktionsänderung wird über 10 Minuten jede Minute abgelesen (Stoppuhr). Ein Leerwert wird nur angesetzt, wenn das Serum stark gefärbt ist. Man mischt in einer Küvette 0,5 ml Serum mit 2,5 ml H_2O, stellt mit dieser Küvette im Strahlengang E = 0,000 ein. Steht nicht genügend Serum zur Verfügung, so kann $NADH_2$ als Leerwert eingesetzt werden (s. hierzu den Leerwert für GPT). Die Extinktionsänderung soll 0,030/min nicht übersteigen; das Serum muß gegebenenfalls verdünnt und der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigt werden.

Berechnung:

Die Extinktionsdifferenz pro Minute ($\Delta E/min$) wird graphisch oder durch Bildung des Mittelwertes aus den Ablesungen ermittelt. Messung bei

366 nm $\Delta E/min \times 1818 = m\mu Mol/ml \times min.$ (mU/ml)
340 nm $\Delta E/min \times 960 = m\mu Mol/ml \times min.$ (mU/ml)
334 nm* $\Delta E/min \times 996 = m\mu Mol/ml \times min.$ (mU/ml)

(* ersetzt 340 nm im Photometer Eppendorf)

Normalwerte im Serum:

5–19 mU/ml

Die Reagenzien zur GOT-Bestimmung können als fertige «Test-Kombination» von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen werden.

GLUTAMAT-DEHYDROGENASE [GDH]

Prinzip:

GDH katalysiert die Reaktion

$$\text{Glutamat} + H_2O + NAD^+ \rightleftharpoons \text{2-Oxoglutarat} + NH_4^+ + NADH + H^+$$

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt unter den gewählten Bedingungen auf seiten des Glutamats. $NADH_2$ wird in äquimolaren Mengen oxydiert und ist Meßgröße.

Reagenzien:

A. Triäthanolaminpuffer, 5×10^{-2} M, pH 8,0 mit Äthylendiamin-tetraacetat (EDTA) 4×10^{-3} M. In ca. 80 ml doppelt destilliertem Wasser werden gelöst: 930 mg Triäthanolamin-hydrochlorid und 149 mg $EDTA\text{-}Na_2\text{-}H_2 \times 2\ H_2O$ (z. B. Titriplex III). Nachdem das pH mit 1 N-NaOH auf 8,0 eingestellt worden ist, wird auf 100 ml mit H_2O aufgefüllt.
B. Ammoniumacetat-Lösung, ca. 3 M. 2,35 g Ammoniumacetat in 10 ml doppelt destilliertem Wasser lösen.
C. $NADH_2$-Lösung, $1{,}2 \times 10^{-2}$ M. 15 mg β-$NADH_2$-Na_2 werden in 1,5 ml einer 1%-$NaHCO_3$-Lösung gelöst.
D. 2-Oxoglutarat-Lösung, ca. 0,4 M. 228 mg Na-2-Oxoglutarat oder 175 mg 2-Oxoglutarsäure in ca. 2 ml doppelt destilliertem Wasser lösen. pH 8 mit 1 N-NaOH einstellen und auf 3 ml auffüllen.

Durchführung der Bestimmung:

Benötigte Serummenge: 1,0 ml. Leichte Hämolyse stört nicht, da Erythrozyten kein GDH enthalten.
In eine 10-mm-Küvette pipettieren:

2,00 ml Puffer (A)
1,00 ml Serum
0,10 ml NH_4^+ (B)
0,05 ml $NADH_2$ (C)

Mit abgeflachtem Glas- oder Polyäthylenstab mischen und für 10 Minuten in ein Wasserbad bei 25 °C stellen. Serumeigene Substrate und Enzyme reagieren unter $NADH_2$-Verbrauch ab. Küvette ins Photometer einsetzen. Tritt keine weitere Extinktionsabnahme ein, dann werden

0,05 ml 2-Oxoglutarat (D)

eingemischt. Die GDH-Reaktion ist jetzt gestartet. Die Extinktionsänderung wird über 10 Minuten jede Minute abgelesen (Stoppuhr). Ein Leerwert wird nur angesetzt, wenn das Serum stark gefärbt ist (z. B. Bilirubin). Man mischt in einer Küvette 1,0 ml Serum mit 2,0 ml H_2O und stellt mit dieser Küvette im Strahlengang E = 0,000 ein. Steht nicht genügend Serum

zur Verfügung, so kann $NADH_2$ als Leerwert eingesetzt werden (s. hierzu Leerwert für GPT). Die Extinktionsänderung soll 0,030/min nicht übersteigen; das Serum muß gegebenenfalls verdünnt und der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigt werden.

Berechnung:

Die Extinktionsdifferenz pro Minute (ΔE/min) wird graphisch oder durch Bildung des Mittelwertes aus den Ablesungen ermittelt.
Messung bei

366 nm $\Delta E/\text{min} \times 969 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
340 nm $\Delta E/\text{min} \times 512 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
334 nm* $\Delta E/\text{min} \times 531 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)

(* ersetzt 340 nm im Photometer Eppendorf)

Normalwerte im Serum:

Serum des Gesunden zeigt keine oder eine nur sehr geringe GDH-Aktivität (< 1 mU/ml)

Die Reagenzien zur GDH-Bestimmung können als fertige «Test-Kombination» von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen werden.

SORBIT-DEHYDROGENASE [SDH]

Prinzip:

SDH katalysiert die Reaktion

$$\text{Sorbit} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Fructose} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Unter den gewählten Versuchsbedingungen liegt das Gleichgewicht auf seiten des Sorbits. $NADH_2$ wird in äquimolaren Mengen oxydiert und ist die Meßgröße.

Reagenzien:

A. Triäthanolaminpuffer, 0,2 M, pH 7,4. In ca. 80 ml doppelt destilliertem Wasser werden 3,72 g Triäthanolamin-hydrochlorid gelöst. Nachdem das pH mit 2 N-NaOH auf 7,4 eingestellt worden ist, wird auf 100 ml mit H_2O aufgefüllt.
B. $NADH_2$-Lösung, $1{,}2 \times 10^{-2}$ M. 15 mg β-$NADH_2$-Na_2 werden in 1,5 ml 1%-$NaHCO_3$-Lösung gelöst.

C. D-Fructose, 72% (Gew./Vol.). 72 g D-Fructose werden in doppelt destilliertem Wasser gelöst, das Volumen wird auf 100 ml gebracht.

Durchführung der Bestimmung:

Benötigte Serummenge: 1,0 ml
In eine 10-mm-Küvette pipettieren:

1,6 ml Puffer (A)
1,0 ml Serum
0,1 ml $NADH_2$ (B)

Mit abgeflachtem Glas- oder Polyäthylenstab mischen und 30 Minuten im Wasserbad bei 25 °C stehenlassen. Serumeigene Substrate und Enzyme reagieren unter $NADH_2$-Verbrauch. Küvette ins Photometer einsetzen. Tritt keine weitere Extinktionsabnahme ein, dann werden

0,3 ml Fructose (C)

eingemischt. Die SDH-Reaktion ist jetzt gestartet. Die Extinktionsänderung wird über 10 Minuten jede Minute abgelesen (Stoppuhr). Ein Leerwert wird nur eingesetzt, wenn das Serum gefärbt ist (z. B. Bilirubin). Man mischt in einer Küvette 1,0 ml Serum mit 2,0 ml H_2O und stellt mit dieser Küvette im Strahlengang $E = 0,000$ ein. Steht nicht genügend Serum zur Verfügung, so kann $NADH_2$ als Leerwert eingesetzt werden (s. hierzu Leerwert für GPT). Die Extinktionsänderung soll 0,030/min nicht übersteigen; das Serum muß gegebenenfalls verdünnt und der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigt werden.

Berechnung:

Die Extinktionsdifferenz pro Minute (ΔE/min) wird graphisch oder durch Bildung des Mittelwertes aus den Ablesungen ermittelt.
Messung bei

366 nm $\Delta E/\text{min} \times 909 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
340 nm $\Delta E/\text{min} \times 480 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
334 nm* $\Delta E/\text{min} \times 498 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)

(* ersetzt 340 nm im Photometer Eppendorf)

Normalwerte im Serum:

Serum des Gesunden zeigt keine oder nur eine sehr geringe SDH-Aktivität
(< 1 mU/ml)

Die Reagenzien zur SDH-Bestimmung können als fertige «Test-Kombination» von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen werden.

CREATIN-KINASE [CK]

Prinzip:

CK katalysiert die Reaktion

$$\text{Creatin} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Creatinphosphat} + \text{ADP}$$

Das in der von links nach rechts verlaufenden Reaktion gebildete ADP wird in der Pyruvat-kinase-Reaktion rephosphoryliert:

$$\text{ADP} + \text{Phosphoenol-pyruvat} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

Die zeitliche Zunahme des dabei gebildeten Pyruvats wird mit LDH und $NADH_2$ gemessen

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

$NADH_2$ wird in äquimolaren Mengen oxydiert und ist Meßgröße.

Reagenzien:

A. Glycinpuffer, 2 M, pH 9,0. 22,5 g Glycin und 6,7 g Na_2CO_3 in doppelt destilliertem Wasser lösen und auf 150 ml auffüllen.

B. Glycinpuffer 0,1 M, pH 9,0. 5 ml Puffer A + 95 ml doppelt destilliertes Wasser.

C. Puffer-Coenzym-Lösung. $NADH_2$ $1{,}3 \times 10^{-3}$ M, ATP 2×10^{-2} M, Phosphoenolpyruvat (PEP) 2×10^{-3} M, $MgSO_4$ 2×10^{-2} M. 17 mg β-$NADH_2$-Na_2, 180 mg ATP-Na_2-$H_2 \times 3$ H_2O, 15 mg PEP (Cyclohexylammoniumsalz) und 40 mg $MgSO_4 \times 7$ H_2O in 15 ml Puffer A lösen.

D. Creatin-Glycinpuffer ($6{,}3 \times 10^{-2}$ M Creatin in 10^{-1} M Glycinpuffer, pH 9,0).
350 mg Creatin in 40 ml Puffer B lösen.

E. Lactat-dehydrogenase-Pyruvatkinase (LDH-PK).
2 mg von jedem Enzymprotein/ml.

Durchführung der Bestimmung:

Benötigte Serummenge: 2 ml, frisch. Leichte Hämolyse stört nicht, da dieses Enzym in Erythrozyten nicht vorkommt. Die Messung muß gegen einen Kontrollwert ausgeführt werden, der Serum, aber kein Creatin enthält. Be-

sonders in pathologischen Seren kommen $NADH_2$-oxydase und PEP hydrolysierende Phosphatasen vor.
In zwei 10-mm-Küvetten pipettieren:

1,00 ml Serum
0,70 ml Puffer-Coenzym (C)
0,05 ml LDH-PK (E)

Mit abgeflachtem Glas- oder Polyäthylenstab mischen und 5 Minuten bei 25 °C im Wasserbad stehenlassen. Pyruvat und ADP, die in PEP bzw. ATP enthalten sind, reagieren mit $NADH_2$. Dann in die Küvetten einmischen.

Enzymküvette
1,75 ml Creatin-Glycinpuffer (D)
Kontrollküvette
1,75 ml Glycin-Puffer (B)

Die CK-Reaktion in der Enzymküvette ist jetzt gestartet. Die Kontrollküvette wird in den Strahlengang gebracht und E wird auf 0,300 eingestellt. Dann wird E für die Enzymküvette abgelesen (E_1) und eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Mit der Kontrollküvette im Strahlengang wird kurz vor dem Ablauf von 10 Minuten auf E = 0,300 nacheingestellt. Nach genau 10 Minuten wird die Extinktion der Enzymküvette abgelesen (E_2). Die Differenz E_1–E_2 = E (CK) wird für die Berechnung benutzt. Ist E (CK) größer als 0,300/10 min, so muß das Serum verdünnt und die Bestimmung wiederholt werden. (Verdünnungsfaktor berücksichtigen!)

Berechnung:

Messung bei

366 nm $\Delta E/10 \text{ min} \times 106 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
340 nm $\Delta E/10 \text{ min} \times 56 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)
334 nm* $\Delta E/10 \text{ min} \times 58 = \text{m}\mu\text{Mol/ml} \times \text{min.}$ (mU/ml)

(* ersetzt 340 nm im Photometer Eppendorf)

Normalwerte im Serum:

Serum des Gesunden zeigt keine oder eine nur sehr geringe CK-Aktivität ($<$ 1 mU/ml)

Die Reagenzien zur CK-Bestimmung können als fertige «Test-Kombination» von der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen werden.

LITERATUR

H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Heidelberg 1963.

H. Mattenheimer: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. 2. Auflage, Verlag Walter De Gruyter, Berlin 1966.

SACHREGISTER

